

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IRINA NASTASSJA RIEDIGER

**APLICABILIDADE DA PCR EM TEMPO REAL AO DIAGNÓSTICO DA
LEPTOSPIROSE HUMANA E AO MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *Leptospira*.**

CURITIBA

2012

IRINA NASTASSJA RIEDIGER

**APLICABILIDADE DA PCR EM TEMPO REAL AO DIAGNÓSTICO DA
LEPTOSPIROSE HUMANA E AO MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *Leptospira*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
do Departamento de Biologia Celular e Molecular,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Prof. Dr. Alexander W. Biondo
Prof. Albert Icksang Ko

Co-orientadores: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Dr. Alex Hoffmaster

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Riediger, Irina Nastassja

Aplicabilidade da PCR em tempo real ao diagnóstico da leptospirose humana e ao monitoramento da contaminação ambiental por espécies patogênicas de *Leptospira*. / Irina Nastassja Riediger. – Curitiba, 2012. 179 p. : il. ; 30cm.

Orientadores: Alexander W. Biondo e Albert Icksang Ko
Coorientadores: Marco Aurélio Krieger e Alex Hoffmaster

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Leptospirose 2. Prognóstico 3. Carga bacteriana I. Título II. Biondo, Alexander Welder III. Ko, Albert Icksang IV. Krieger, Marco Aurélio V. Hoffmaster, Alex VI. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.


CDD (20. ed.) 589.99

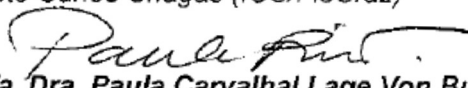
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

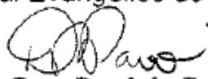
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Co-Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas (ICC/FioCruz)


Profa. Dra. Paula Carvalho Lage Von Buettner Ristow
Universidade Federal da Bahia - UFBA


Profa. Dra. Eliete Caló-Romero
Instituto Adolfo Lutz - IAL


Prof. Dr. Felipe Tuon
Hospital Evangélico de Curitiba


Profa. Dra. Daniela Parada Pavoni
Instituto Carlos Chagas (ICC/FioCruz)

E tendo como suplentes,

Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após argüir a candidata **Irina Nastassja Riediger**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Aplicabilidade da PCR em Tempo Real ao Diagnóstico da Leptospirose Humana e ao Monitoramento da Contaminação Ambiental por Espécies Patogênicas de *Leptospira*", são de parecer favorável à ~~aprovação~~ ^{APROVAÇÃO} da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2012

Para minha mãe, Eliana
Que nunca mediu esforços
Para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo. Tenho certeza de que a colaboração de cada um foi imprescindível para a elaboração e execução bem sucedidas deste trabalho. Agradeço em especial:

Ao Dr. Albert Icksang Ko, meu orientador e mentor, pela oportunidade de conviver com seu brilhantismo, seriedade e competência na pesquisa. Muito obrigada pela confiança, pelas oportunidades, pelas chances de discutir, de aprender (de epidemiologia e estatística a informática e redação), de pesquisar, de fazer a Ciência acontecer. Muitas vezes eu desejei ter maior capacidade de aprendizado para aproveitar ao máximo tudo o que posso aprender com você. É com muita gratidão que levo comigo seu exemplo. Obrigada pelos acarajés e por me mostrar que o meu limite está sempre além!

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, orientador desse trabalho, meu mais sincero respeito e admiração. Agradeço a você pelo enriquecimento pessoal e profissional durante esses quase sete anos de convivência, durante os quais trabalhamos juntos por uma visão social e integrativa da pesquisa e da Ciência no Brasil.

Aos meus co-orientadores em Atlanta, Dr. Alex Hoffmaster e Dr^a. Robyn A. Stoddard (*my guarding Angel*), e a todos os colegas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Meu “muito obrigada!” por tornarem realidade meu sonho de estudar no exterior, pela oportunidade profissional que mal posso mensurar, pelo aprendizado, pela confiança que depositaram no meu trabalho, pelo apoio incondicional e por me fazerem sempre sentir em casa em Atlanta.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Marco Krieger, que generosamente assumiu a responsabilidade pela minha orientação durante o período de afastamento do Prof. Dr. Alexander Biondo.

As Equipes do Serviço de Epidemiologia do Hospital das Clínicas da UFPR e da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, em especial à Dr^a. Suzana Dal Ri Moreira e

Dr^a. Marion Burger, pela preciosa colaboração na seleção de pacientes. A nossa parceria permite que eu atinja o meu objetivo maior, que é ver de perto a aplicação do meu trabalho, ajudando a diagnosticar e, em alguns casos, salvar a vida dos nossos pacientes.

Minha gratidão à Cláudia, Déborah, Luciana, Helena, da Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, pela amizade, incentivo e apoio irrestrito (mesmo quando isso significou assumir mais responsabilidades para que eu pudesse passar um ano afastada da instituição). Aos mais novos amigos, Maria do Carmo, Ednéia e Érico pela motivação, tão genuína, quanto à importância do suporte laboratorial para a Saúde Pública brasileira.

A minha amiga, parceira e mentora Sueli Nakatani pela generosidade; pelo incentivo quando eu achei que ia dar tudo errado; pelo apoio quando eu achei que não ia dar conta do recado; pelas discussões técnico-científicas sobre PCR em tempo real; pelas críticas, sempre construtivas; pelos artigos escritos a quatro mãos e tudo mais. Su, não tenho palavras para agradecer!

Agradeço ao Cesar Duarte pelo apoio, pelo incentivo, pelas oportunidades e pela confiança. Obrigada pela revisão crítica da tese e pelo exemplo de profissionalismo.

A Irene Skraba e Didiane Tscha, da Seção de Virologia do LACEN-PR, minha gratidão pelo acesso aos resultados dos testes MAT e isolamento e pelo espírito de cooperação sempre que precisei.

Meus agradecimentos à direção do Laboratório Central do Estado do Paraná, em especial a Dr^a. Célia Fagundes da Cruz e ao Dr. Marcelo Pilonetto, que acreditaram no meu projeto e nas suas hipóteses. Obrigado por viabilizarem e reforçarem as parcerias, o que permitiu a execução prática deste trabalho.

Aos colegas do Instituto Carlos Chagas (ICC-FIOCRUZ/PR) e do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) pela ajuda na construção do controle interno. Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Stenio Perdigão Fragoso e aos colegas Adriana e Leonardo pelas orientações técnicas e pela gentileza ao ceder equipamentos e reagentes sempre que precisei.

A Mari e aos estagiários da Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, pelo auxílio fundamental no processamento das amostras.

Aos colegas do CPqGM-Fiocruz/BA: Prof. Mitermayer, Eliana, Guiga, Monique, Elsio, Paula, Dani, José, Nivison, Renan, Andréia, Jacke, Alcinéia, Gisele, Nilzelene, Soraia, Nandinha, Jailton. Muito obrigada por sempre terem confiado no meu trabalho, por me deixarem à vontade em Salvador, pelo companheirismo e amizade nesses anos de convivência. Um agradecimento especial ao Federico, meu guru da estatística, cuja ajuda foi essencial para as análises de dados.

A Fernanda Monego, pelos anos de companheirismo e dificuldades partilhadas e pela ajuda técnica.

A minha mãe, Eliana e ao meu irmão, Gunnar; pelo incentivo, pelo apoio incondicional e pelo respeito irrestrito às minhas decisões (mesmo quando nem eu sabia direito o que estava fazendo). Pelos telefonemas, por aguentarem os meus choramingos e por encararem o frio do hemisfério Norte em pleno verão tropical para que eu não ficasse muito tempo sozinha em Atlanta. A admiração de vocês pelo meu trabalho é a minha força-motriz e a principal razão da minha satisfação pessoal. Ao meu pai, Ivan, por me ensinar lições preciosas que me permitiram chegar até aqui.

A minha madrinha, Berenice, por ser literalmente a minha segunda mãe. Por fazer da sua casa a minha casa em Salvador, o que viabilizou e tornou prazerosas minhas longas estadas na cidade. Muito obrigada por sempre me receber com tanto carinho, pelos passeios, pelas conversas, pelos conselhos, pelas broncas e pelas revigorantes visitas a Itacimirim!

Aos meus queridos amigos, Aline Miyazato (irmã do coração) e Ernani Taguchi, pela cumplicidade e amizade durante todos esses anos. Obrigada pelos “vamos tomar uma?” e por me mostrarem diariamente que com perseverança é possível superar os obstáculos mais difíceis.

Ao meu grande amigo, Carlos Caetano, por todos os anos de convivência. Agradeço a você pelo apoio, pela compreensão e pela paciência. Essa tese é um pouco sua também!

A minha amiga Mayra, por estar sempre presente e pelas palavras de apoio e carinho nos momentos difíceis. Obrigada, miga!

Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, em especial aos Profs. Drs. Silvio Sanches Veiga e Edvaldo Trindade, pelo apoio sempre que precisei e pela compreensão nos momentos difíceis.

Aos membros da banca, por gentilmente cederem seu tempo para avaliar esse trabalho, contribuindo com críticas e sugestões.

Minha gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao *National Institutes of Health* (NIH) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que não mencionei, mas cuja colaboração foi essencial ao desenvolvimento desse projeto.

“As pedras no caminho,
eu as recolho.
Um dia
montarei um castelo.”
(Fernando Pessoa)

“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende”
(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de veiculação hídrica que tem distribuição mundial e cuja sintomatologia é inespecífica. Humanos desenvolvem formas graves de leptospirose e os métodos diagnósticos atuais não são eficazes para a detecção precoce da doença. O uso de um método de PCR em tempo real pode permitir o diagnóstico precoce e a quantificação das bactérias em amostras clínicas; além da quantificação do risco ambiental em amostras de água. Foi demonstrado que o método permite a detecção das leptospirosas em amostras de sangue total coletadas nos primeiros seis dias de doença, após os quais a carga bacteriana decai de modo inversamente proporcional ao título de anticorpos. O limite mínimo de detecção foi estimado em 280 GEq/mL. O ponto de corte prognóstico foi estimado em 159 GEq/mL para o desenvolvimento de LPHS, com sensibilidade de 64,3% (IC 95% 35,1-87,2%), especificidade de 68,8% (IC 95% 62,8-74,3%) e acurácia 68,0%. Para óbito, o ponto de corte prognóstico foi definido em 1.181 GEq/mL, com sensibilidade de 76,5% (IC 95% 50,1-93,2%), especificidade de 89,3% (IC 95% 85,0-92,8%) e acurácia de 88,3%. A seleção do kit para extração do DNA e estabelecimento de parâmetros de concentração, volume inicial de amostra e limite mínimo de detecção permitiu a adaptação do método de qPCR para a quantificação das leptospirosas em amostras ambientais. O método adaptado foi validado em estudo conduzido com amostras ambientais coletadas na comunidade de Pau da Lima, em Salvador (Bahia, Brasil). Os resultados apontaram maior positividade entre as amostras coletadas em baixa altitude (50% das amostras positivas), bem como entre as amostras coletadas pela manhã em comparação com a tarde (17,7% vs. 5,8%). A positividade foi maior entre amostras de esgoto do que entre amostras de água empoçada (17,7% vs. 5,6%). Também houve diferença de positividade entre as amostras coletadas nos períodos úmido e com umidade intermediária (16,0% vs. 9,7%). Assim, concluímos que o método de qPCR é uma ferramenta útil para o diagnóstico e avaliação prognóstica em pacientes com suspeita clínica de leptospirose. O método também foi eficaz na identificação de possíveis focos de infecção a partir da avaliação de amostras de água coletadas em área endêmica.

Palavras-chave: *Leptospira*, leptospirose, PCR em tempo real, sangue total, carga bacteriana, prognóstico, amostra ambiental de água.

SUMMARY

Leptospirosis is a waterborne zoonosis with worldwide distribution, which symptoms are non-specific. Humans develop severe forms of leptospirosis and the current diagnostic methods are not suited for the early diagnosis of the disease. The use of a real-time PCR method allowed for an early diagnosis and bacterial quantification in clinical samples, as well as quantification of environmental burden in water samples. It has been shown that this method allows for the detection of leptospires in whole blood samples obtained during the first six days of illness, after which the bacterial load decrease is inversely proportional to the raise in antibody titer. The lower limit of detection was estimated to be 280 GEq/mL. The prognostic threshold was estimated at 159 GEq/mL for the development of LPHS, with sensitivity of 64.3% (95% CI 35.1-87.2%), specificity of 68.8% (95% CI 62.8-74.3%) and accuracy of 68.0%. For death, the prognostic threshold was set at 1.181 GEq/mL, with sensitivity of 76.5% (95% CI 50.1-93.2%), specificity of 89.3% (95% CI 85.0-92.8%) and accuracy of 88.3%. Selection of the commercial kit for DNA extraction, and establishment of concentration parameters, initial sample volume and lower limit of detection led to the adaption of the qPCR method to allow for the quantification of leptospires in environmental samples. The adapted method was validated in a study conducted with environmental samples collected in the slum community of Pau da Lima, in Salvador (Bahia, Brazil). Results showed a higher positivity for samples collected at low altitudes (positivity of 50%), as well as for samples collected in the morning when compared to those collected in the afternoon (17.7% vs. 5.8%). Positivity was also higher for sewage than for puddle water (17.7% vs. 5.6%). There was also difference in positivity for samples collected during the wet season when compared to those collected during the period with intermediate humidity (16.0% vs. 9.7%). Therefore, we conclude that the qPCR method is a useful tool for the diagnosis and prognostic evaluation of patients with a clinical suspicion of leptospirosis. The method was also reliable in identifying possible infection sites through the evaluation of water samples collected from an endemic area.

Keywords: *Leptospira*, leptospirosis, real time PCR, whole blood, bacterial load, prognosis, environmental water sample.

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Espécies do gênero <i>Leptospira</i> classificadas segundo seu potencial patogênico.....	24
Figura 1 - Representação esquemática simplificada da arquitetura da parede celular das leptospiros.	25
Figura 2 – História natural da leptospirose.....	36
Figura 3 - Sistema óptico de equipamento de PCR em tempo real com excitação por lâmpada halógena.....	43
Figura 4 - Etapas de geração das curvas-resposta por PCR em tempo real, em escala linear.....	44
Figura 5 – Sistema de monitoramento de PCR em tempo real por sonda de hidrólise.	48
Tabela 2 - Cepas de <i>Leptospira</i> utilizadas na execução do MAT.....	59
Figura 6 – Procedimento de extração de DNA genômico utilizando o kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit.	62
Tabela 3 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para detectar os genes <i>lipL32</i> e <i>RPP30</i>	64
Figura 7 – Representação esquemática da construção do inserto de DNA usado na síntese do controle interno.	78
Tabela 4 – Sequências dos oligonucleotídeos usados para gerar o fragmento de DNA utilizado na construção do controle interno.	79
Figura 8 – Sítio múltiplo de clonagem do vetor M13mp18.	80
Figura 9 – Localização dos sítios de anelamento dos iniciadores M13pUC-F e M13pUC-R (setas azuis) na sequência nucleotídica do vetor M13mp18 (GenBank X02513.1).....	83
Figura 10 – Caracterização geográfica, topográfica e epidemiologia da leptospirose na comunidade de Pau da Lima (Salvador, BA).....	85
Figura 11 – Esquema para coleta de amostras ambientais.....	87
Tabela 5 – Características dos casos confirmados de leptospirose recrutados em Salvador e Curitiba e incluídos na validação diagnóstica de método baseado em PCR em tempo-real.	91

Figura 12- Avaliação da linearidade do método baseado em PCR em tempo real. ..	92
Figura 13 – Avaliação da acurácia e determinação do efeito de matriz biológica sobre o desempenho do teste baseado em PCR em tempo real.	93
Tabela 6 – Análise de precisão do método baseado em PCR em tempo real.	94
Tabela 7 – Dados utilizados para análise de regressão probit.	95
Tabela 8 – Comparação entre resultados de PCR em tempo real frente à confirmação laboratorial para amostras de sangue total em EDTA e soro de casos confirmados, não confirmados e grupos-controle.	96
Tabela 9 – Sensibilidade e especificidade diagnósticas e valores preditivos para o método baseado em PCR em tempo na análise de amostras de sangue total em EDTA e soro.	96
Figura 14 – Sensibilidade do teste baseado em PCR em tempo real em relação ao título recíproco do MAT para pacientes com suspeita clínica de leptospirose, estratificados por dias com sintomas.	98
Figura 15 – Fluxograma para seleção de pacientes.	99
Figura 16 – Relação entre dias com sintomas (eixo x), sensibilidade da qPCR (1º eixo y), carga bacteriana (2º eixo y) e título recíproco de MAT (3º eixo y).	102
Tabela 11 – Características dos casos (n=280) incluídos na avaliação da correlação entre carga bacteriana, covariáveis de risco e desfechos.	103
Tabela 12 – Identificação de fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome de Hemorragia Pulmonar associada à Leptospirose (LPHS).	106
Tabela 13 – Identificação de fatores de risco para óbito em decorrência da leptospirose.	107
Figura 17 – Curvas ROC para determinação do ponto de corte da carga bacteriana associado ao desenvolvimento de LPHS (A) ou óbito (B).	109
Tabela 15 – Impacto de diferentes protocolos de centrifugação na recuperação do DNA de leptospiros a partir de quatro matrizes de água contaminadas artificialmente.	111
Figura 18 – Efeito da contaminação artificial com diferentes quantidades de <i>E. coli</i> sobre a recuperação do DNA de <i>Leptospira</i>	112
Figura 19 – Seleção do volume inicial de amostra ambiental para quantificação do DNA de <i>Leptospira</i> por qPCR.	113

Figura 20 – Demonstração do intervalo de linearidade e do efeito de matriz para as diferentes matrizes de água ambiental.....	115
Tabela 16 – Limites mínimos de detecção calculados por análise probit e parâmetros matemáticos das retas obtidas por regressão linear a partir de dados de diluições seriadas de <i>Leptospira</i> em diferentes matrizes de água.	116
Figura 21 – Confirmação do produto de PCR gerado por <i>overlapping extension</i> PCR, usado como inserto para produção do controle interno.	117
Figura 22 – Resultado da digestão do vetor M13mp18 com a enzima de restrição <i>Sma</i> I, com posterior desfosforilação com SAP.....	118
Figura 23 – Confirmação da presença do inserto em uma das <i>plaques</i> positivas selecionadas.	118
Figura 24 – Amplificação da diluição seriada 1:10 do <i>armored</i> DNA, até 10^{-5} /mL, usado como controle interno para as amostras ambientais.	120
Tabela 17 – Características amostrais e resultados obtidos para quantificação do DNA de leptospiros patogênicas em amostras ambientais de água.	122
Figura 25 – Média geométrica da quantificação (\pm DP) de DNA de <i>Leptospira</i> em amostras de água ambientais positivas por qPCR coletadas em julho (A) e outubro (B) de 2011.	124

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- percentagem
°C	- Graus Celsius
ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
BSA	- <i>Bovine serum albumin</i>
CAAT	- <i>Cross-adsorption agglutination test</i>
C3	- Componente 3 do sistema complemento
CCD	- Dispositivo de carga acoplada
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
CN	- Controle negativo
CP	- Controle positivo
CV	- Coeficiente de variação
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleosídeo Trifosfatado
DP	- Desvio Padrão
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMJH	- Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris
EP	- Espaço Periplasmático
<i>et al.</i>	- Abreviação da expressão latina <i>et alii</i> , para demais colaboradores
FAM	- 6-carboxifluoresceína
fg	- Fentograma (10^{-15} g)
$\times g$	- Força centrífuga
GLP	- Glicolipoproteína
GEq	- Equivalentes de genoma
h	- Horas
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	- Vírus T-linfotrópico Humano

IC 95%	- Intervalo de Confiança de 95%
IFN- γ	- Interferon γ
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
ipm	- Incursões Respiratórias por Minuto
IPTG	- Isopropil- β -D-galactopiranosídeo
IRA	- Insuficiência Renal Aguda
Kb	- Kilobase
KCl	- Cloreto de potássio
LACEN-PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
LCR	- Líquido cefaloraquidiano
LED	- Diodo emissor de luz
LMD	- Limite Mínimo de Detecção
LPHS	- <i>Leptospirosis-associated Hemorrhagic Pulmonary Syndrome</i>
LPS	- Lipopolissacarídeos
MAT	- <i>Microscopic Agglutination Test</i>
Mb	- Megabases
ME	- Membrana Externa
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
MI	- Membrana Interna
min	- Minuto
mL	- Mililitro (10^{-3} L)
MLST	- <i>Multiple Loci Sequence Typing</i>
MLVA	- <i>Multiple Loci VNTR Analysis</i>
mM	- Milimolar
mmHg	- Milímetros de Mercúrio
MP	- Marcador de Massa Molecular
NaCl	- Cloreto de sódio
ng	- Nanograma (10^{-9} g)
NK	- <i>Natural Killer Cell</i>
nm	- Nanômetro (10^{-9} m)
NTC	- Controle negativo de DNA

OR	- Razão de chances (<i>odds ratio</i>)
Pb	- Pares de bases
PBS	- Tampão fosfato-salino
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pg	- Picograma (10^{-12} g)
PFGE	- Eletroforese em Campo Pulsado
PG	- Peptidoglicano
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pmol	- Picomol (10^{-12} mol)
qPCR	- PCR em tempo real quantitativa
RFLP	- <i>Random Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	- Rotações por minuto
RNA	- Ácido Ribonucléico
ROX	- Carbóxi-X-rodamina
rRNA	- Ácido Ribonucléico Ribossômico
s	- Segundos
SAP	- <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SESA-PR	- Secretaria de Estado da Saúde, Paraná
TAMRA	- Carboxitetrametilrodamina
TBE	- Tampão Tris-Borato-EDTA
Th1	- Linfócito T auxiliar 1
Th2	- Linfócito T auxiliar 2
TLR	- <i>Toll-like receptor</i>
TNF α	- Fator de Necrose Tumoral α
Tris	- Hidroximetilaminometano
U	- Unidade
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultravioleta
VHB	- Vírus da Hepatite B
VHC	- Vírus da Hepatite C
X-GAL	- 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo
μ g	- Micrograma (10^{-6} g)
μ L	- Microlitro (10^{-6} L)

μm	- Micrometro (10^{-6} m)
μM	- Micromolar (10^{-6} mol)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	23
2.2	MORFOLOGIA E METABOLISMO	25
2.3	EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO	27
2.4	IMUNOPATOGENESE	28
2.5	HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA E ASPECTOS CLÍNICOS	34
2.6	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	38
2.6.1	Microscopia.....	38
2.6.2	Isolamento	39
2.6.3	Técnicas sorológicas	41
2.6.4	PCR em tempo real	42
2.7	SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	49
2.8	MEDIDAS PREVENTIVAS	49
2.8.1	Vacinas.....	49
2.8.2	Medidas não-vacinais	50
2.9	MONITORAMENTO DO RISCO AMBIENTAL.....	51
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	54
3.1	JUSTIFICATIVA.....	54
3.2	OBJETIVOS.....	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA	57
4.1.1	Casuística	57
4.1.2	Amostras biológicas.....	58
4.1.3	Isolamento de <i>Leptospira</i> a partir de hemocultura	58
4.1.4	MAT	59
4.1.5	Experimentos de contaminação <i>in vitro</i> para padronização da qPCR	60
4.1.6	Extração de DNA	61

4.1.7	Construção da curva de calibração.....	62
4.1.8	Pesquisa do gene RPP30.....	63
4.1.9	Detecção do gene <i>lipL32</i>	64
4.1.10	Ensaio para validação analítica do método diagnóstico.....	65
4.1.11	Avaliação do desempenho diagnóstico do método.....	68
4.1.12	Análises estatísticas	68
4.2	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE CARGA BACTERIANA E DESFECHO CLÍNICO EM CASOS DE LEPTOSPIROSE.....	68
4.2.1	Casuística	69
4.2.2	Amostras biológicas.....	69
4.2.3	Confirmação laboratorial.....	70
4.2.4	Extração de DNA	70
4.2.5	Construção da curva de calibração.....	71
4.2.6	Quantificação do DNA bacteriano por qPCR.....	71
4.2.7	Análises estatísticas	72
4.3	OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	72
4.3.1	Matrizes ambientais de água	73
4.3.2	Experimentos de contaminação <i>in vitro</i>	73
4.3.3	Seleção do kit para extração de DNA.....	74
4.3.4	Otimização dos parâmetros de concentração das amostras	74
4.3.5	Otimização do processo de sedimentação das amostras.....	75
4.3.6	Determinação do volume ótimo de amostra	75
4.3.7	Determinação do limite mínimo de detecção para cada matriz ambiental.....	75
4.3.8	Quantificação do DNA bacteriano por qPCR.....	76
4.3.9	Análises estatísticas	77
4.4	MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGENICAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	77
4.4.1	Construção do controle interno.....	77
4.4.2	Local do estudo	84
4.4.3	Desenho experimental.....	85
4.4.4	Coleta de amostras.....	86

4.4.5	Concentração das amostras	87
4.4.6	Extração de DNA	87
4.4.7	Quantificação do DNA bacteriano por qPCR	88
4.4.8	Análises estatísticas	88
5	RESULTADOS	90
5.1	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA.....	90
5.1.1	Caracterização dos pacientes.....	90
5.1.2	Determinação do intervalo de linearidade e eficiência.....	92
5.1.3	Determinação da acurácia e do efeito de matriz biológica.....	92
5.1.4	Determinação da precisão	93
5.1.5	Determinação da sensibilidade analítica.....	95
5.1.6	Desempenho diagnóstico da PCR em tempo real	95
5.2	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE CARGA BACTERIANA E DESFECHO CLÍNICO EM CASOS DE LEPTOSPIROSE	99
5.2.1	Seleção dos pacientes.....	99
5.2.2	Caracterização dos pacientes.....	100
5.2.3	Identificação de covariáveis de risco para desfechos graves	105
5.2.4	Determinação dos pontos de corte prognósticos	108
5.3	OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	110
5.3.1	Seleção do kit para extração de DNA.....	110
5.3.2	Seleção do protocolo de concentração.....	111
5.3.3	Determinação do volume inicial de amostra	112
5.3.4	Determinação do efeito de matriz e sensibilidade analítica	114
5.4	MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	116
5.4.1	Construção do controle interno.....	116
5.4.2	Coleta de amostras ambientais de água em Pau da Lima.....	120
5.4.3	Localização e frequência da detecção do DNA de <i>Leptospira</i> em amostras ambientais de água	121

5.4.4	Associação entre a matriz ambiental de água e a detecção de DNA de <i>Leptospira</i>	122
5.4.5	Quantificação do DNA de <i>Leptospira</i> em amostras ambientais de água	122
6	DISCUSSÃO	126
6.1	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA.....	126
6.2	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE CARGA BACTERIANA E DESFECHO CLÍNICO EM CASOS DE LEPTOSPIROSE	129
6.3	OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	136
6.4	MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE <i>LEPTOSPIRA</i>	140
7	CONCLUSÕES	146
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	148
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
10	ANEXOS.....	171
10.1	ANEXO 1: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS.....	171
10.2	ANEXO 2: FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	172
10.3	ANEXO 3: FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS.....	174

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce da leptospirose é essencial, especialmente nos casos que se apresentam como formas graves da doença. Uma vez que as manifestações clínicas iniciais são inespecíficas, o diagnóstico laboratorial permite direcionamento terapêutico rápido e eficaz dos pacientes infectados.

Os métodos tradicionalmente utilizados para o diagnóstico laboratorial são ELISA-IgM, MAT e cultura microbiológica, sendo o MAT considerado o método padrão-ouro. Como ELISA-IgM e MAT são ensaios sorológicos, em muitos casos faz-se necessário aguardar a soroconversão (que ocorre cerca de sete dias após o início dos sintomas) para obter-se resultados confirmatórios. No caso do MAT, é recomendada a avaliação de amostras de soro pareadas, coletadas com intervalo mínimo de sete dias. Alternativamente, é possível demonstrar a presença da bactéria através de métodos microbiológicos. As leptospirosas apresentam crescimento lento em meio de cultura, o que inviabiliza o uso do cultivo como método diagnóstico de triagem por possuir baixa sensibilidade.

Dentro deste contexto, o emprego de um sistema de diagnóstico molecular com ensaios de hibridização pós-PCR associado à detecção em tempo real (como TaqMan®) apresentou altas sensibilidade e especificidade. Esse método otimizado também tornou possível eliminar eventuais etapas de processamento pós-PCR, diminuindo o risco de contaminações e consequentes resultados falso-positivos, além de conferir agilidade ao laboratório por reduzir o tempo necessário para a liberação do resultado.

Por sua natureza quantitativa, a PCR em tempo real também permitiu mensurar a carga de DNA bacteriano nas amostras analisadas, avaliando sua correlação com o desfecho clínico dos pacientes para estabelecer linhas de corte nos prognósticos relacionados a óbito e outros desfechos graves como quadros de hemorragia pulmonar.

Como a leptospirose é uma doença de veiculação hídrica e cuja infecção ocorre frequentemente no ambiente peridoméstico, a quantificação da carga bacteriana em amostras de água coletadas em áreas com alta prevalência mostrou-se capaz de identificar possíveis fontes de infecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A leptospirose é considerada a zoonose de mais ampla distribuição mundial (BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001), com importância epidemiológica nos contextos urbano e rural de países de clima tropical e temperado (KO *et al.*, 1999). Exibe evidente caráter sazonal, que coincide com o período chuvoso do ano (PAPPACHAN *et al.*, 2004). A ocorrência da leptospirose está relacionada à situação socioeconômica e sanitária da população, apresentando, portanto, incidências distintas entre as diferentes classes sociais. Enquanto nos países desenvolvidos a leptospirose é considerada uma doença re-emergente e ocupacional (KO *et al.*, 2009), a mesma constitui um problema de Saúde Pública nos países em desenvolvimento como o Brasil, afetando populações negligenciadas que não dispõem de estrutura sanitária básica (KO *et al.*, 1999).

2.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A leptospirose é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, taxonomicamente classificado na ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*. Os gêneros taxonomicamente reconhecidos nessa família são *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella* (PASTEUR, 2010).

A classificação do gênero *Leptospira* era baseada exclusivamente em reações sorológicas até 1989, com divisão em duas espécies ou complexos: *L. interrogans*, que compreendia todas as cepas patogênicas; e *L. biflexa*, que compreendia as cepas saprofíticas. As duas espécies foram divididas em mais de 300 sorovares, que são as unidades taxonômicas básicas do gênero (KMETY & DIKKEN, 1992), determinadas com base em reações sorológicas no teste de adsorção de aglutinação cruzada (CAAT, do inglês *Cross-Agglutination Adsorption Test*). Os sorovares antigenicamente relacionados são organizados em sorogrupos. As duas espécies são diferenciadas pela capacidade de crescimento de *L. biflexa* a 11-13°C na presença de 8-azaguanina e pela incapacidade de formar células esféricas em NaCl 1 M (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999; JOHNSON & ROGERS, 1964).

Tabela 1 - Espécies do gênero *Leptospira* classificadas segundo seu potencial patogênico.

Potencial patogênico	Espécie
Patogênicas	<i>Leptospira interrogans</i> <i>Leptospira kirschneri</i> <i>Leptospira borgpetersenii</i> <i>Leptospira santarosai</i> <i>Leptospira noguchii</i> <i>Leptospira weilii</i> <i>Leptospira alexanderi</i> <i>Leptospira alstoni</i>
Saprofiticas	<i>Leptospira biflexa</i> <i>Leptospira wolbachii</i> <i>Leptospira kmetyi</i> <i>Leptospira meyeri</i> <i>Leptospira vanthielii</i> <i>Leptospira terpstrae</i> <i>Leptospira yanagawae</i>
Intermediárias	<i>Leptospira inadai</i> <i>Leptospira broomii</i> <i>Leptospira fainei</i> <i>Leptospira wolfii</i> <i>Leptospira licerasiae</i>

Fonte: (KO *et al.*, 2009).

A classificação sorológica das leptospiros tem gradativamente dado lugar à classificação molecular (genotípica), na qual várias espécies de leptospiros, além de *L. interrogans* e *L. biflexa*, foram estabelecidas com bases genéticas (YASUDA *et al.*, 1987). Como os mecanismos genéticos que determinam a expressão de antígenos sorovar-específicos em genomoespécies diferentes ainda não foram elucidados, em geral a classificação genotípica em genomoespécies não coincide com a classificação fenotípica. A classificação sorológica em sorovares não é capaz, portanto, de prever a espécie molecular da cepa bacteriana e, conseqüentemente, sua classificação taxonômica; deste modo, é possível que cepas da mesma genomoespécie não pertençam necessariamente ao mesmo sorogrupo (LEVETT, 2007; 2001). Análises filogenéticas mostraram que as 20 genomoespécies descritas são agrupadas em três grandes grupos que compreendem as

cepas patogênicas, intermediárias e saprofíticas (Tabela 1) (KO *et al.*, 2009; LEVETT, 2007; BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001; BRENNER *et al.*, 1999).

2.2 MORFOLOGIA E METABOLISMO

As leptospiros são espiroquetas móveis altamente espiraladas, medindo de 10 a 20 µm de comprimento e cerca de 0,1 µm de diâmetro. Todas as leptospiros apresentam, como as demais espiroquetas, uma arquitetura de parede celular distinta (Figura 1). Essa estrutura apresenta similaridades tanto com bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Assim como nas primeiras, a membrana interna (citoplasmática) é intimamente relacionada à parede celular de peptidoglicanos (PG). Já a membrana externa é rica em lipopolissacarídeos (LPS). Entretanto, estudos utilizando criofratura da parede celular mostraram que a membrana externa das espiroquetas apresenta menor conteúdo proteico do que a das bactérias gram-negativas, sendo mais fluida e lábil (ADLER & FAINE, 2006). Paralelamente, a membrana externa das leptospiros e demais espiroquetas parece ter baixa densidade de proteínas transmembranas e grande quantidade de lipoproteínas (KO *et al.*, 2009; HAAKE & MATSUNAGA, 2005). Os LPS da parede celular das leptospiros possuem composição química e características tintoriais similares aos das bactérias gram-negativas, mas apresentam atividade endotóxica menor.

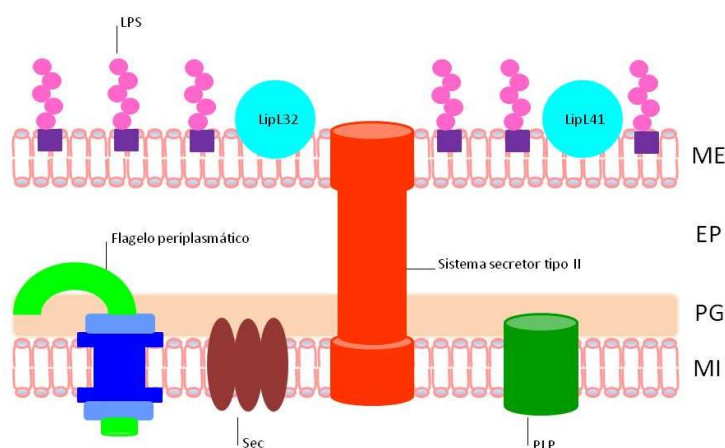


Figura 1 - Representação esquemática simplificada da arquitetura da parede celular das leptospiros.

As leptospiros possuem uma membrana interna (MI) e uma membrana externa (ME). Entre as duas membranas está o espaço periplasmático (EP) e a parede celular de

peptidoglicanos (PG). Associadas a essas estruturas estão algumas das principais proteínas da MI, como a proteína ligante de penicilina (PLP); e o *translocon* Sec, responsável pelo transporte transmembrana das lipoproteínas a partir do citoplasma. Ancorados na ME estão os lipopolissacarídeos (LPS), porinas como OmpL1 (não representada) e várias lipoproteínas, entre elas LipL32 e LipL41.
Fonte : (KO *et al.*, 2009) (tradução nossa).

As leptospiros têm extremidades pontiagudas que, diferentemente de outras espiroquetas, usualmente apresentam forma de gancho em uma ou ambas as extremidades. Dois filamentos axiais (flagelos modificados), com inserções periplasmáticas polares ancoradas no complexo de peptidoglicanos da membrana interna, atravessam todo o protoplasma (WOLGEMUTH *et al.*, 2006; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999). A forma helicóide cilíndrica e a movimentação dos dois filamentos axiais levam aos movimentos rotacionais e translacionais, o que sugere que as bactérias penetrem ativamente nos tecidos do hospedeiro através do movimento de saca-rolhas (KO *et al.*, 2009; BHARTI *et al.*, 2003; FAINE *et al.*, 1999; BINDER & MERMEL, 1998).

As leptospiros patogênicas são bactérias fastidiosas, aeróbias obrigatórias e apresentam crescimento ótimo entre 28 e 30°C em meio com pH 7,2-7,6, produzindo catalase e oxidase. Ácidos graxos são utilizados como fonte primária de carbono e metabolizados por β -oxidação (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999). Apesar de serem metabolicamente essenciais, os ácidos graxos são tóxicos para as leptospiros e devem ser apresentados às bactérias na presença de um composto detoxicante como a albumina sérica bovina (BSA). As leptospiros não fermentam carboidratos nem os utilizam como fonte de carbono. Amônia é um micronutriente essencial ao crescimento das leptospiros, serve como fonte única de nitrogênio e pode ser introduzida no meio como sais de amônio ou como produtos de deaminação de aminoácidos. Também são essenciais cianocobalamina (vitamina B₁₂), tiamina (vitamina B₁), íons fosfato, cálcio, magnésio e ferro (Fe⁺³ ou grupo heme) (LEVETT, 2007; ADLER & FAINE, 2006; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

O meio de Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris (ELLINGHAUSSEN & MCCULLOUGH, 1965), é o meio de cultura mais utilizado para o crescimento de leptospiros e pode ser adquirido comercialmente. Em meio líquido, o crescimento bacteriano é caracterizado pela birrefringência ou turbidez do meio de cultura. O crescimento das leptospiros em meio semissólido pode ser percebido como um anel circular opaco que se desenvolve alguns milímetros abaixo da superfície do meio, conhecido como anel de Dinger (LEVETT, 2007; ADLER & FAINE, 2006). Quando

cultivadas em meio semissólido, as cepas podem permanecer viáveis por longos períodos desde que armazenadas em tubos bem fechados e guardados à temperatura ambiente ao abrigo da luz (ADLER & FAINE, 2006).

2.3 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A leptospirose é considerada a zoonose de maior incidência mundial e afeta tanto a população urbana quanto a rural em países com clima tropical (ROMERO *et al.*, 2003; KO *et al.*, 1999), subtropical (MEITES *et al.*, 2004) ou temperado (JANSEN *et al.*, 2005). Essa patologia exhibe claro caráter sazonal em regiões tropicais, em que o período chuvoso do ano é marcado por altas temperaturas (MCBRIDE *et al.*, 2005; PAPPACHAN *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2003), sendo descrita nos cinco continentes (VIEIRA *et al.*, 2006; SAMBASIVA *et al.*, 2003; SEIJO *et al.*, 2002; KO *et al.*, 1999).

Tradicionalmente reconhecida nos países desenvolvidos como doença ocupacional (HERNANDEZ *et al.*, 2005; BELMAKER *et al.*, 2004; NATARAJASEENIVASAN *et al.*, 2002; CAMPAGNOLO *et al.*, 2000; SUAREZ HERNANDEZ *et al.*, 1999; VAN CHARANTE *et al.*, 1998; WAITKINS, 1986), atualmente a leptospirose é cada vez mais associada a atividades recreacionais (MONAHAN *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2006; NARITA *et al.*, 2005; HAAKE *et al.*, 2002), eventos esportivos (HOCHEDÉZ *et al.*, 2011; BOLAND *et al.*, 2004; SEJVAR *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2002), viagens (GROBUSCH *et al.*, 2003) e turismo de aventura (SENIOR, 2010; STERN *et al.*, 2010; SEJVAR *et al.*, 2003), sendo também descrita como patologia re-emergente (MEITES *et al.*, 2004; BINDER & MERMEL, 1998).

Um perfil diferente se observa em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde a epidemiologia e as altas taxas de prevalência da leptospirose estão intimamente relacionadas às condições socioeconômicas da população (REIS *et al.*, 2008; MCBRIDE *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; PLANK & DEAN, 2000; KO *et al.*, 1999). A Organização das Nações Unidas estima que 31,6% da população urbana mundial residam em favelas, o que corresponde a um bilhão de pessoas. Essa porcentagem sobe para 43% da população urbana nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (PROGRAMME, 2003). Estima-se que a população mundial das favelas deva dobrar nos próximos 20 anos e a leptospirose tende

a tornar-se cada vez mais um paradigma para a Saúde Pública nessas comunidades (REIS *et al.*, 2008; PROGRAMME, 2003), em que a infecção acontece provavelmente no peridomicílio (MACIEL *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2008).

A ausência de estrutura sanitária básica nas favelas produziu condições ecológicas ideais para a instalação de um quadro endêmico em países como o Brasil (SOARES *et al.*; REIS *et al.*, 2008; MCBRIDE *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; BARCELLOS & SABROZA, 2000; KO *et al.*, 1999). Acredita-se que a maioria dos casos brasileiros seja causada por um único clone de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (REIS *et al.*, 2008; ROMERO *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2000; KO *et al.*, 1999), o que fortalece o papel do rato doméstico como principal reservatório, uma vez que *Rattus rattus* e *R. norvegicus* são os carreadores mais comuns desse sorovar (REIS *et al.*, 2008; SUNBUL *et al.*, 2001; KO *et al.*, 1999; VINETZ *et al.*, 1996).

A transmissão da leptospirose ocorre pelo contato direto ou indireto com o material biológico (principalmente urina) de animais contaminados, que podem ser divididos em hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais (BHARTI *et al.*, 2003). A doença se mantém na natureza pela infecção crônica, endêmica e assintomática dos túbulos renais dos hospedeiros de manutenção. Animais de outras espécies podem ser contaminados pelo contato com a urina do hospedeiro de manutenção, tornando-se hospedeiros acidentais (BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

2.4 IMUNOPATOGENESE

Através da secreção de enzimas líticas e do movimento ativo de saca-rolhas, acredita-se que as leptospiplas possam penetrar ativamente no organismo do hospedeiro através de cortes ou abrasões na pele, através das mucosas, conjuntivas, ou através da pele íntegra após imersão prolongada em água contaminada (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Após a invasão as bactérias colonizam os rins, que propiciam uma localização segura para a multiplicação bacteriana e sua manutenção e eliminação intermitente do organismo do hospedeiro, garantindo assim a perpetuação do ciclo zoonótico na natureza (LEVETT, 2001).

A penetração das leptospiplas patogênicas pode ser direcionada por quimiotaxia, o que raramente acontece com as cepas saprofíticas (YURI *et al.*, 1993). Além disso, foi

demonstrado que a transição das leptospiros patogênicas do ambiente para o organismo do hospedeiro é sinalizada, entre outros fatores, pela osmolaridade fisiológica. A migração de um ambiente de baixa osmolaridade (fora do hospedeiro) para um ambiente de osmolaridade maior (dentro do organismo do hospedeiro) induz um aumento da expressão das proteínas de membrana externa LigA e LigB (MATSUNAGA *et al.*, 2007), fato diretamente relacionado a um aumento na adesão das leptospiros a proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno, laminina, fibronectina e fibrinogênio. A adesão de LigA e LigB a múltiplos ligantes presentes em diferentes tecidos sugere que essas proteínas possam estar envolvidas nos estágios de colonização inicial e disseminação das bactérias pelo organismo do hospedeiro (CHOY *et al.*, 2007); (BARBOSA *et al.*, 2006). As leptospiros são capazes de aderir a diferentes tipos celulares e essa aderência envolve as duas extremidades celulares da bactéria, ao contrário do que ocorre com *Treponema pallidum*, que só adere às células através de uma das extremidades. Também foram encontradas bactérias localizando-se no interior do citoplasma das células hospedeiras em experimentos *in vitro* (THOMAS & HIGBIE, 1990). Apesar disso, não foram encontradas evidências de multiplicação intracitoplasmática ou qualquer perturbação às estruturas celulares citoesqueléticas ou de membrana. Isso sugere que as leptospiros sejam bactérias invasivas, mas não intracelulares facultativas. O caráter invasivo é um fator de virulência importante, visto que permite às bactérias atravessar rapidamente monocamadas celulares através da translocação celular, o que as protege do ataque de células do sistema imunológico e facilita a entrada e saída da corrente sanguínea para infectar órgãos-alvo, como os rins (BAROCCHI *et al.*, 2002).

A caracterização e comparação dos proteomas de membrana externa de leptospiros expressos em cultivo *in vitro* e durante o processo patológico apontaram um aumento significativo na expressão das proteínas de membrana Loa22 e LipL32, contra uma diminuição na expressão das demais proteínas hidrofóbicas (NALLY *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que um mutante obtido pela inserção do *transposon Himar 1* no gene *loa22* se tornou avirulento em um modelo animal, através de estudos utilizando mutagênese randômica por *transposon*. A posterior complementação da cepa *loa22* por inserção cromossômica do gene *loa22* mostrou que a perda da virulência era decorrente da inativação do gene *loa22* e não de um sítio secundário de mutação. Esses resultados demonstraram que a proteína Loa22 é essencial para o processo de infecção *in vivo* por

leptospiras patogênicas, levando à primeira demonstração molecular da atividade de um fator de virulência (RISTOW *et al.*, 2007).

O sistema imune dos mamíferos consiste de imunidade inata e adaptativa, ambos importantes no combate à infecção por leptospiras. O sistema imune adaptativo é mediado por células T antígeno-específicas e por células B, enquanto o sistema imune inato é filogeneticamente conservado e é o primeiro a ser ativado na defesa do hospedeiro contra micro-organismos patogênicos. A ativação da via alternativa do sistema complemento é dos mecanismos efetores mais importantes durante as primeiras horas de infecção. Recentemente, surgiu grande interesse na imunidade inata com a descoberta de receptores de patógenos codificados por linhagens germinativas, chamados *Toll-like receptors* - TLR (SCHROPPEL & HE, 2006). Parece que os TLR controlam a ativação da resposta imune adaptativa. Esses receptores reconhecem especificamente padrões moleculares associados a patógenos ou expressos pelos agentes infecciosos, como componentes microbianos exógenos como LPS (TLR4), lipoproteínas e peptidoglicanos (TLR1, -2, -6), RNA viral (TLR3), dinucleotídeos guanosina-citosina não-metilados de origem bacteriana ou viral (TLR9) e moléculas endógenas como proteína do choque térmico e moléculas da matriz extracelular. Quando esses receptores são estimulados, a sinalização mediada pelos TLR ativa vias de transdução de sinal (fator nuclear κ B, fator nuclear p38, interleucina-6, fator regulatório de interferon), que induzem a expressão de citocinas, quimiocinas e proteínas celulares de membrana relacionadas à resposta inflamatória (SCHROPPEL & HE, 2006). As leptospiras são capazes de ativar macrófagos através de interações dos LPS com CD14, receptor que reconhece vários antígenos bacterianos. Os LPS das bactérias Gram-negativas ativam TLR4, resultando numa resposta pró-inflamatória dependente de quimiocinas e citocinas. Leptospiras, entretanto, possuem LPS com potencial endotóxico menor e ativam macrófagos humanos através de TLR2 ao invés de TLR4 (FRAGA *et al.*, 2011; YANG, 2007), enquanto ambas as vias são ativadas em modelos animais resistentes à infecção (EVANGELISTA & COBURN, 2010). Uma vez que o padrão de reconhecimento de LPS em murinos (hospedeiros de manutenção) é mediado tanto por TLR2 quanto por TLR4, enquanto em humanos o reconhecimento se dá exclusivamente via TLR2, é possível que a haja uma falha de reconhecimento dos LPS em humanos, levando à ativação inadequada da resposta imune celular e consequente suscetibilidade à infecção (FRAGA *et al.*, 2011; EVANGELISTA & COBURN, 2010). O interferon- γ (IFN-

γ) é uma citocina pró-inflamatória pluripotente produzida principalmente por células T ativadas e células *natural killer* e desempenha um papel central na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares. Foi comprovado que os macrófagos ativados produzem interleucina-12 (IL-12), a citocina mais potente em induzir a produção de IFN- γ . A IL-12 liberada pelos macrófagos estimula a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linfócitos T auxiliares produtores de IFN- γ , o que sugere a indução de resposta imune celular (DE FOST *et al.*, 2003).

Como as leptospiros são patógenos extracelulares, a imunidade adquirida depende da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento. Na leptospirose, a maior parte dos anticorpos específicos é direcionada contra os LPS de membrana. Uma vez que essas moléculas são diferencialmente expressas para cada sorovar, a imunidade adquirida não confere proteção cruzada contra a infecção por outro sorovar que não o envolvido na infecção primária ou àqueles que são antigenicamente relacionados (FÉLIX *et al.*, 2011; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Outros antígenos reconhecidos pela resposta imune humoral humana incluem LipL32 (principal lipoproteína de membrana), LipL41 e proteínas de choque térmico obtidas da fração citoplasmática das bactérias, como GroEL e DnaK (GUERREIRO *et al.*, 2001). Em muitos modelos experimentais, foi demonstrado que a fagocitose das leptospiros por neutrófilos e macrófagos só é efetiva se o patógeno estiver opsonizado por IgG específicas. Além da opsonização, esses anticorpos podem aglutinar leptospiros e ativar a via clássica do sistema complemento (FRAGA *et al.*, 2011). Enquanto IgG1 e IgG2 agem como opsoninas, aumentando potencialmente o número de leptospiros fagocitadas, somente IgG1 é capaz de fixar complemento – o que pode ser um importante mecanismo efetor para o controle da leptospirose (NAIMAN *et al.*, 2002).

TLR são diferencialmente expressos em leucócitos e células não imunes e parecem regular aspectos importantes da resposta imune inata e adaptativa. Células tubulares renais estão entre as células não imunes que expressam TLR, sugerindo que esses receptores podem contribuir para a ativação da resposta imune em caso de dano túbulo-intersticial. A ativação dos TLR pode ser crucial no desenvolvimento de quadros como choque séptico, síndromes com resposta inflamatória sistêmica e resposta imune local, pois induzem a maturação de células dendríticas e ativação de macrófagos tissulares. A ativação dos macrófagos promove secreção local de citocinas e quimiocinas e contribui para a inflamação local e acumulação linfocitária. Em contrapartida, a

maturação das células dendríticas leva à migração celular do sítio danificado para os linfonodos regionais para apresentar antígenos e sinais pró-inflamatórios a células T, o que é um pré-requisito para o estabelecimento da resposta imune adaptativa (ANDERS *et al.*, 2004). Experimentos *in vitro* mostram que a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias por células renais túbulo-proximais, induzida por proteínas de membrana extraídas de leptospiros patogênicos, é mediada por TLR2. Esses resultados implicam a participação crucial da imunidade inata (via TLR2) na patogênese da nefrite túbulo-intersticial induzida por leptospiros (YANG, 2007; HUNG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2001).

Paralelamente, a lise bacteriana mediada pela resposta imune do hospedeiro libera GLP citoplasmáticas. Entre os vários antígenos isolados de leptospiros, a fração de ácidos graxos insaturados não-esterificados (ácidos oléico, linoléico, palmítico, palmitoléico e mirístico) das endotoxinas do tipo GLP ativam células polimorfonucleares, com liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e interleucinas (BURTH *et al.*, 2005; DORIGATTI *et al.*, 2005; DIAMENT *et al.*, 2002). Os ácidos graxos não esterificados ligam-se à albumina para o transporte pela corrente sanguínea, o que neutraliza seus efeitos citotóxicos. Entretanto, na presença de grandes quantidades dessas moléculas, os sítios de ligação da albumina são saturados. Essa saturação pode ser devida tanto ao aumento da quantidade de ácidos graxos circulantes quanto ao aumento nos níveis séricos de bilirrubina, que compete pelos mesmos sítios de ligação à albumina. Sabe-se que um dos mecanismos responsáveis pela citotoxicidade dos ácidos graxos não esterificados é a alteração da fluidez de membrana e a consequente interferência na atividade de diversos mecanismos de transporte transmembrana, incluindo o transporte ativo de Na⁺ e K⁺. O comprometimento do transporte transmembrana desses íons em células alveolares pode ter papel crucial no desenvolvimento de edema pulmonar, através de perturbações à atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (BURTH *et al.*, 2005). Foi demonstrado que uma fração de GLP extraída de leptospiros patogênicos inibe seletivamente várias isoformas de Na⁺,K⁺-ATPase. Postulou-se que a quantidade de GLP gerada a partir das bactérias encontradas em infecções *in vivo* seja suficiente para inibir completamente a isoforma renal (YOUNES-IBRAHIM *et al.*, 1997a; YOUNES-IBRAHIM *et al.*, 1997b). Apesar dessa situação extrema, uma inibição parcial seria suficiente para induzir alterações patológicas. A comparação interespecíes mostrou que tanto isoformas de Na⁺,K⁺-ATPase de espécies suscetíveis quanto de espécies resistentes à doença são sensíveis à inibição por GLP.

Isso sugere que a resistência de uma espécie à doença não resulta da resistência das suas células à ação das GLP, mas sim da quantidade de toxina liberada a nível tissular, que varia com o grau de colonização dos tecidos, que por sua vez depende de respostas imunológicas espécie-específicas. A avaliação desses achados sugere que as inibições celulares induzidas pela inibição da Na^+, K^+ -ATPase em tecidos infectados possam ser responsáveis por vários sintomas, em particular aqueles associados às desordens eletrolíticas, como distúrbios eletrolíticos renais, arritmia cardíaca e diarreia. Dependendo do grau de intensidade da inibição enzimática, os sintomas podem variar de disfunções metabólicas discretas à falência de órgãos (YOUNES-IBRAHIM *et al.*, 1997a; YOUNES-IBRAHIM *et al.*, 1997b).

Acredita-se que a hemorragia pulmonar causada pelas leptospiros seja desencadeada por vasculite capilar associada às toxinas. O tecido pulmonar de pacientes com leptospirose usualmente apresenta contagem de organismos menor do que o tecido renal ou hepático, sugerindo que as anormalidades pulmonares podem ser devidas à exposição a toxinas circulantes produzidas pelo patógeno em sítios distantes como o fígado (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007b). Apesar das toxinas ainda não terem sido identificadas (ADLER & MOCTEZUMA, 2010), o processo de anotação dos genomas revelou a presença de genes putativos para codificação de proteases e hemolisinas que podem estar envolvidas no processo de dano pulmonar (FRAGA *et al.*, 2011). A análise do tecido pulmonar de pacientes após o óbito por leptospirose mostrou edema dos septos intra-alveolares; infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, linfócitos e plasmócitos; tumefação endotelial e hemorragia alveolar. Não foram encontradas evidências de formação de trombos ou de coagulação intravascular disseminada. Antígenos de leptospiros foram detectados por imunohistoquímica na superfície luminal do endotélio e no citoplasma das células endoteliais.

Apesar da quantificação de bactérias não ter sido correlacionada com a intensidade das lesões, é possível que a detecção de leptospiros intactas e material antigênico granular nas células endoteliais indique que a pneumopatia seja desencadeada diretamente pelas leptospiros ou por seus produtos tóxicos (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007b; a). A reprodução do padrão de infecção humana em primatas, utilizando cepas isoladas de pacientes com quadro pulmonar severo, resultou em hemorragia intra-alveolar com infiltrado inflamatório intersticial, achado morfológico peculiar que parece ser produzido por uma resposta inflamatória intensa com

extravasamento de eritrócitos para o exterior dos capilares. Entretanto, ressalta-se que esses dados não foram encontrados em outras síndromes de fragilidade capilar que progridem para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), como dengue hemorrágica ou síndrome pulmonar da hantavirose. Material antigênico foi encontrado no parênquima pulmonar, intimamente associado com áreas de alteração histológica (PEREIRA *et al.*, 2005). Com base em achados obtidos em um modelo animal (NALLY *et al.*, 2004), Croda e colaboradores (CRODA *et al.*, 2010) especularam que o aumento na permeabilidade vascular acontece como resultado da ativação endotelial, superprodução de óxido nítrico e abertura das junções intercelulares leva ao extravasamento de IgG, IgA e IgM para o espaço alveolar. A deposição de imunoglobulinas direcionadas contra pneumócitos tipo I (células pavimentosas) e II (células cuboidais) nos septos alveolares mediaría a ativação do sistema complemento com deposição de C3. Isso poderia levar à necrose de células do epitélio endotelial com consequente extravasamento celular e hemorragia no lúmen alveolar.

Desse modo, as lesões primárias em todas as formas de leptospirose são decorrentes de danos mecânicos ou tóxicos causados pelas leptospirosas ou por reações imunomediadas às membranas das células endoteliais dos vasos sanguíneos. O efeito imediato é o extravasamento de fluidos para o espaço extravascular, incluindo também o extravasamento de eritrócitos quando os danos são mais intensos. Uma cadeia de eventos subsequentes (isquemia, anóxia, hipertensão local) leva à perda da integridade estrutural e funcional em determinados órgãos e tecidos-alvo, determinando a apresentação clínica e as características macro e microscópicas das lesões associadas à leptospirose (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007b; DIAMENT *et al.*, 2002; FAINE *et al.*, 1999). Entretanto, a severidade da doença depende também do tamanho do inóculo, de características de virulência da cepa infectante e de peculiaridades relacionadas à resposta imune de cada indivíduo (KO *et al.*, 2009; GANOZA *et al.*, 2006; GANOZA & VINETZ, 2006).

2.5 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA E ASPECTOS CLÍNICOS

Após a infecção, a leptospirose tem um período de incubação de cerca de uma semana, após a qual a história natural da doença progride com o desenvolvimento da

resposta imune (Figura 2). A maior parte dos casos de infecção por leptospiras em humanos é subclínica ou com sintomatologia muito branda (FAUCHER *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2003). Nesses casos o paciente raramente procura atendimento médico e assim estima-se que haja subnotificação (BRUM & KUPEK, 2005; MCBRIDE *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2003). Uma proporção menor de pacientes (casos confirmados) apresenta uma síndrome anictérica febril aguda (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999). Os principais sinais e sintomas relatados na apresentação são febre, calafrios, cefaleia, mialgia, sufusão conjuntival, anorexia, vômitos e prostração. Como a sintomatologia é inespecífica, deve-se proceder ao diagnóstico diferencial com uma variedade de infecções virais e bacterianas, principalmente arboviroses (SLACK *et al.*, 2007; SPICHLER *et al.*, 2005; LEVETT, 2001; BINDER & MERMEL, 1998; HUDSON *et al.*, 1997; KEE *et al.*, 1994; RAMACHANDRAN *et al.*, 1976; ALEXANDER *et al.*, 1963). A taxa de mortalidade é baixa nas formas leves e os sintomas normalmente desaparecem em uma semana, coincidindo com a soroconversão (KO *et al.*, 2009; BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

Quadros de meningite asséptica podem ocorrer em até 25% dos casos de leptospirose, sendo mais comum em crianças (ROMERO *et al.*, 1998). A principal manifestação neurológica durante a fase inicial da doença é o meningismo, seguido por manifestações neurológicas como dores de cabeça, vômitos e sinais de irritação meníngea que caracterizam a fase imune da leptospirose. A análise citoquímica do líquido revela aumento de proteínas, nível normal de glicose e pleocitose com predomínio de células polimorfonucleares (BHARTI *et al.*, 2003).

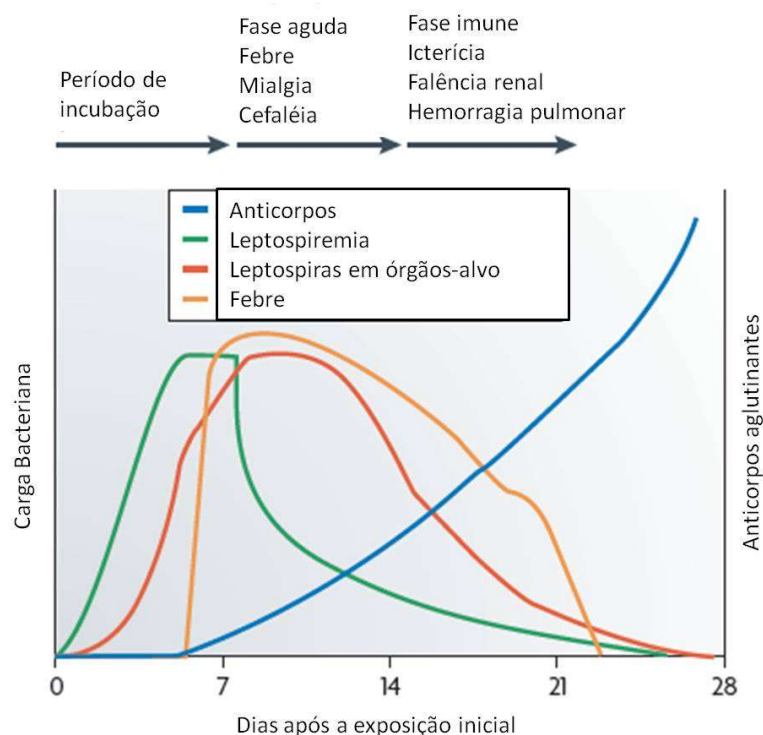


Figura 2 – História natural da leptospirose.

Fonte: (KO *et al.*, 2009) (tradução nossa).

Cerca de 10% dos casos de leptospirose se apresentam como uma síndrome íctero-febril aguda (Síndrome de Weil), cuja evolução clínica é rápida e progressiva (KO *et al.*, 2009; BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999). As complicações clínicas dessa forma de manifestação enfatizam o caráter multisistêmico da doença (LEVETT, 2001). Os sintomas classicamente associados à Síndrome de Weil (tríade de Weil) são insuficiência renal aguda (VISITH & KEARKIAT, 2005; CETIN *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2001; ABDULKADER, 1997), diáteses hemorrágicas associadas à trombocitopenia (STEFOS *et al.*, 2005; EDWARDS *et al.*, 1986; EDWARDS *et al.*, 1982) e icterícia (MORGAN *et al.*, 2002). Pode ocorrer também o comprometimento pulmonar (SPICHLER *et al.*, 2008a; DOLHNIKOFF *et al.*, 2007b; IM *et al.*, 1989), as alterações cardíacas (KEE *et al.*, 1994) e o comprometimento ocular (RATHINAM, 2005). A forma ictérica da leptospirose acomete cerca de 10% dos casos e a taxa de mortalidade varia de 5 a 15% (BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001). A concentração de bilirrubina sérica total pode ser bastante alta (cerca de 40 mg/dL) e durar semanas até a normalização. A elevação na concentração de transaminases normalmente é moderada, com aumento secundário na concentração de fosfatase alcalina. A icterícia associada à leptospirose

não é devida ao dano hepatocelular, mas sim à colestase relacionada ao processo de sepse bacteriana com prejuízo à secreção de bilirrubina direta dependente de ATP através dos canalículos biliares. A função hepática retorna à normalidade após o período de convalescença (BHARTI *et al.*, 2003).

Há disfunção renal em todas as formas de leptospirose, mas sintomas de insuficiência renal ocorrem apenas nas formas graves. A proteinúria é o achado mais comum na urinálise, mas há em geral piúria e hematúria microscópicas e visualização de cilindros hialinos e granulares. A diátese hemorrágica pode determinar hematúria macroscópica. A insuficiência renal aguda é relatada em 16-40% dos casos e normalmente é hipocalêmica e não-oligúrica. Embora eventualmente reversível, a insuficiência renal aguda é a principal causa de morte na síndrome de Weil, sendo oligúria e hipercalemia importantes fatores de risco associados ao óbito. As manifestações renais da leptospirose são descritas como uma combinação de dano tubular agudo e nefrite intersticial, sendo a inflamação provavelmente um efeito secundário do dano tubular agudo. Esse, por sua vez, pode ser devido à ação tóxica de componentes da célula bacteriana sobre as células epiteliais tubulares; ou ser um efeito secundário da hipóxia devido à isquemia. A isquemia é decorrente das alterações hemodinâmicas que ocorrem nos casos graves como resultado da desidratação, de hemorragias maciças, ou da permeabilidade alterada dos capilares, secundária à vasculopatia. Com o restabelecimento da volemia, pode haver poliúria por deficiência de reabsorção tubular. A lesão é mais intensa no néfron proximal e o aumento da oferta de sódio ao néfron terminal tende a produzir hipocalemia, para a qual também pode contribuir a inibição da Na^+, K^+ -ATPase (CERQUEIRA *et al.*, 2008; BHARTI *et al.*, 2003).

Os quadros de Síndrome Hemorrágica Pulmonar associada à Leptospirose (LPHS, do inglês *Leptospirosis-associated Pulmonary Hemorrhage Syndrome*) foram descritos pela primeira vez no início dos anos 1990 (TREVEJO *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1989) e sua incidência tem aumentado significativamente nos últimos anos, podendo ocorrer nas formas ictéricas e anictéricas da doença com hemorragia pulmonar de intensidade suficiente para levar à morte (KO *et al.*, 2009; FAINE *et al.*, 1999; IM *et al.*, 1989). A LPHS é a manifestação clínica mais grave da leptospirose e tem gradativamente substituído a Síndrome de Weil como *causa mortis* em grande parte dos casos fatais de leptospirose (GOUVEIA *et al.*, 2008). Os sintomas pulmonares normalmente surgem

entre o quarto e o sexto dia de doença e podem levar à morte em menos de 72 horas, com taxas de mortalidade de até 60% (DOLHNIKOFF *et al.*, 2007b; a).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Como a sintomatologia da leptospirose é sindrômica, portanto inespecífica, a suspeita clínica deve ser confirmada através do diagnóstico laboratorial. Além dos parâmetros hematológicos, são recomendadas análises bioquímicas para avaliação das funções hepática e renal, além dos testes específicos para o diagnóstico da leptospirose. As técnicas utilizadas para esse fim consistem majoritariamente de métodos diretos para a demonstração do agente ou de determinados antígenos específicos; demonstração microbiológica da bactéria a partir do isolamento *in vitro*; ou pesquisa molecular do material genético bacteriano. Também são utilizadas técnicas sorológicas para o diagnóstico indireto da infecção, principalmente ensaios de ELISA IgM e testes de microaglutinação (MAT). O diagnóstico laboratorial da leptospirose é essencialmente o mesmo em humanos e animais e as amostras biológicas mais comumente utilizadas são soro, sangue total e líquido cefalorraquidiano (LCR). Amostras de urina podem ser utilizadas em ensaios diretos por microscopia, mas a baixa sensibilidade dessas técnicas leva a um alto percentual de resultados falso-negativos (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

2.6.1 Microscopia

Dentre os métodos microbiológicos diretos está a pesquisa de leptospiros por microscopia, utilizando preparados a fresco observados em microscopia de campo escuro ou preparações fixadas e coradas observadas em microscopia de luz ou de fluorescência.

Apesar de ser tradicionalmente relacionada ao diagnóstico da leptospirose e à detecção da leptospiúria, a observação de preparações de urina à fresco em campo escuro apresenta sensibilidade e especificidade muito baixas. Teoricamente, uma

concentração de 10^4 leptospiras/ml de urina seria suficiente para haver visualização de uma célula por campo em aumento de $100\times$. Na prática, o limite de detecção da técnica oscila entre 10^5 e 10^6 leptospiras/ml, o que só ocorre em casos muito graves (LEVETT, 2007; ADLER & FAINE, 2006). A morfologia e a motilidade típicas das leptospiras devem ser levadas em consideração na observação das preparações. Além disso, é importante ter em mente que a interpretação do exame é subjetiva e depende da experiência do observador, o que em muitos casos pode levar a diagnósticos equivocados na presença de estruturas como fibras têxteis ou espermatozoides, extrusões celulares ou outras espiroquetas como *Treponema* (CHANDRASEKARAN & GOMATHI, 2004).

Apesar de serem consideradas bactérias gram-negativas, as leptospiras não são apropriadamente visualizadas pelas técnicas de coloração de Giemsa ou Gram em virtude de sua forma delgada (ADLER & FAINE, 2006). As técnicas de fixação e coloração específicas para espiroquetas utilizam os métodos de Whartin-Starry ou Fontana-Tribondeau, baseados na impregnação por sais de prata. Entretanto, ambas as colorações são utilizadas em estudos histológicos, juntamente com colorações imunohistoquímicas (LEVETT, 2007; FAINE *et al.*, 1999).

2.6.2 Isolamento

Como em outras infecções bacterianas, a presença do patógeno isolado a partir de sangue total ou urina de pacientes é o método definitivo para o diagnóstico da doença. Apesar de o isolamento permitir o diagnóstico direto, o crescimento das leptospiras é lento. Isolados primários podem demorar meses para se adaptar e crescer nas condições de cultivo *in vitro*. Subcultivos puros em meio líquido normalmente apresentam crescimento em 7 a 10 dias. Apesar de apresentar alta especificidade, esse método é pouco usado para fins diagnósticos devido à baixa sensibilidade e ao longo período necessário para o crescimento bacteriano. Como o tempo necessário para a liberação de um resultado pode chegar a três meses, a cultura é usada como método confirmatório, associada aos métodos moleculares e aos métodos sorológicos indiretos como ELISA IgM e MAT. Entretanto, o isolamento das bactérias tem importância fundamental nas investigações epidemiológicas, sendo essencial para a identificação do sorovar envolvido em surtos ou epidemias, ou mesmo do sorovar circulante em determinada área

geográfica. Isso permite melhor compreensão do ciclo zoonótico na região, facilitando e melhorando a elaboração de políticas para o controle da doença (TERPSTRA, 2003).

O método sorológico convencional para a identificação dos isolados de *Leptospira* baseia-se no CAAT (do inglês *Cross-Adsorption Agglutination Test*), em que as cepas são colocadas em contato com painéis de soro hiperimune de coelho direcionados contra cepas de referência, sendo o padrão de reação das cepas comparado a seguir. Esse método é laborioso e caro, uma vez que os painéis de soro hiperimune não estão disponíveis comercialmente e devem ser produzidos e exaustivamente caracterizados pelos laboratórios. Alguns laboratórios de referência produzem painéis de anticorpos monoclonais que podem ser usados para a sorotipagem, mas sua produção também é técnica e financeiramente dispendiosa, limitando sua aplicabilidade (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

O método de referência para a tipagem molecular bacteriana é a determinação do grau de homologia entre as cepas a partir de ensaios de hibridização de DNA (ADLER & FAINE, 2006) ou sequenciamento completo do gene 16S rRNA. Alguns métodos moleculares, como RFLP (do inglês *Random Fragment Length Polymorphism*) (KAWABATA *et al.*, 2001; HEINEMANN *et al.*, 2000), *arbitrarily primed*-PCR (AP-PCR) (OLIVEIRA *et al.*, 2003; LETOCART *et al.*, 1997; CABALLERO *et al.*, 1994), foram desenvolvidos com o intuito de classificar os isolados em genomoespécies. Para a resolução ao nível de subespécies, a primeira técnica utilizada fazia uso da análise de restrição por endonucleases (REA, do inglês *Restriction Endonucleases Analysis*), cujos resultados obtidos com essa técnica forneceram as primeiras evidências do grau de diversidade genética possível entre cepas classificadas como pertencentes ao mesmo sorovar (SAVIO *et al.*, 1994).

As técnicas de tipagem molecular evoluíram com a utilização de endonucleases cujos sítios de restrição são esparsos no genoma bacteriano, com posterior análise do perfil de restrição em eletroforese em campo pulsado (PFGE). Algumas técnicas de PFGE geram perfis de restrição únicos para cada genótipo, permitindo excelente correlação entre o sorovar e o genótipo (ROMERO *et al.*, 2009; GALLOWAY & LEVETT, 2008). Outra técnica promissora para a tipagem molecular das leptospirosas é o MLST (do inglês *Multilocus Sequence Typing*) (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2006), que se baseia no sequenciamento parcial de genes constitutivos para determinar seus alelos e na posterior avaliação da combinação de alelos para determinar o genótipo

(nesse caso, o *Sequence Type* ou ST). Também estão descritas algumas metodologias baseadas em MLVA (do inglês *Multiple-Locus VNTR Analysis*) (PAVAN *et al.*, 2008; SALAUN *et al.*, 2006; SLACK *et al.*, 2006; MAJED *et al.*, 2005; SLACK *et al.*, 2005). Essa técnica se baseia na determinação de alelos para *loci* VNTR polimórficos entre as cepas, e na posterior avaliação conjunta dos alelos para determinar o genótipo (SALAUN *et al.*, 2006; SLACK *et al.*, 2006; SLACK *et al.*, 2005). Apesar do alto grau de resolução, as técnicas descritas até o momento não são capazes de distinguir genótipos altamente relacionados, mas classificados em diferentes sorovares - caso dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae. Além disso, essas técnicas podem não ser aplicáveis simultaneamente a todas as genomoespécies (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2006). A redução de custos relacionada ao sequenciamento de genomas completos através de técnicas tipo *next-generation sequencing* talvez permita futuramente a execução de estudos de genômica comparativa com o objetivo de identificar alvos moleculares informativos para a distinção genotípica de cepas e sorovares altamente relacionados.

2.6.3 Técnicas sorológicas

Em virtude das limitações relativas aos métodos diagnósticos diretos apontadas anteriormente, a maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por métodos sorológicos. Os anticorpos anti-*Leptospira* são detectáveis no soro em aproximadamente sete dias após o início dos sintomas. Os métodos sorológicos podem ser divididos em dois grupos: gênero-específicos e sorogrupo-específicos (LEVETT, 2001). Entre os métodos gênero-específicos estão os testes ELISA IgM (MCBRIDE *et al.*, 2007a; MCBRIDE *et al.*, 2007b), ensaios tipo *dipstick* (SMITS *et al.*, 2000; SMITS *et al.*, 1999a; SMITS *et al.*, 1999b; GUSSENHOVEN *et al.*, 1997) e imunocromatografia de fluxo lateral (*lateral flow*) (SEHGAL *et al.*, 2003; SMITS *et al.*, 2001).

O MAT, considerado o método padrão-ouro sorológico, consiste na reação do soro do paciente com diluições seriadas de um painel de culturas de leptospiros e é capaz de detectar a presença, determinar o título e a especificidade quanto ao sorogrupo dos anticorpos IgM e IgG presentes no soro do paciente. Em regiões endêmicas, um título ≥ 800 é altamente sugestivo de infecção corrente ou recente. Apesar de ser o teste

sorológico com maiores sensibilidade e especificidade, a execução da técnica e a leitura do teste devem ser realizadas por profissionais experientes. Como a técnica exige a manutenção de uma coleção de cepas-padrão e capacitação do operador, apenas laboratórios de referência costumam realizar o MAT. Outra desvantagem importante é a necessidade de avaliação de amostras de soro pareadas, coletadas com um intervalo mínimo de 15 dias, para demonstração da soroconversão ou do aumento significativo do título de anticorpos (igual ou maior a quatro vezes) e se efetuar um diagnóstico conclusivo (LEVETT, 2007; ADLER & FAINE, 2006; TERPSTRA, 2003; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999).

2.6.4 PCR em tempo real

O desenvolvimento da PCR, descrito por Kary Mulis e colaboradores (MULLIS & FALOONA, 1987), permitiu que essencialmente qualquer sequência de ácidos nucleicos presente numa amostra biológica pudesse ser amplificada num processo cíclico para gerar um grande número de cópias idênticas, que podem ser imediatamente analisadas. Esse processo tornou possível, por exemplo, manipular o DNA para clonagem, realizar ensaios de engenharia genética e sequenciar genomas (WATZINGER *et al.*, 2006). Entretanto, como técnica analítica quantitativa, o método de PCR original apresenta algumas limitações, que foram resolvidas com o desenvolvimento da PCR em tempo real por Higuchi e colaboradores (HIGUCHI *et al.*, 1992). A técnica foi desenvolvida com base num equipamento em que foram acoplados um termociclador, um sistema óptico e uma câmara CCD (do inglês *Charge-Coupled Device*). De maneira geral, todos os equipamentos de PCR em tempo real possuem uma fonte de emissão de luz, que pode ser uma lâmpada halógena ou de LED, ou um feixe de laser. À frente da fonte de luz estão colocados os filtros de excitação, que selecionam o comprimento de onda específico para a excitação de cada fluoróforo presente na reação. A luz é então direcionada para a placa de amostras através de um conjunto de espelhos dicróicos. Os fluoróforos presentes na amostra são excitados e emitem fluorescência, que é direcionada pelos espelhos para o filtro de emissão. Esse filtro seleciona a luz emitida nos comprimentos de onda específicos de cada fluoróforo presente na reação. A luz selecionada é direcionada para a câmara CCD, que converte o sinal luminoso em sinal

eletrônico, utilizado pelo software gerenciador do equipamento para o traçado gráfico da reação (Figura 3) (HIGUCHI *et al.*, 1992). Na PCR em tempo real, o processo de amplificação é acompanhado durante o curso da reação de PCR por monitoramento da fluorescência dos corantes introduzidos na reação, a qual é proporcional à quantidade de produto de PCR formado, enquanto o número de ciclos necessário para obter uma quantidade determinada de moléculas de DNA é registrado. Assumindo uma determinada eficiência na amplificação, que normalmente é próxima à duplicação do número de moléculas por ciclo de amplificação, é possível calcular o número de cópias da sequência-alvo presente inicialmente na amostra. Com a utilização de químicas de detecção altamente eficientes, instrumentos sensíveis e ensaios otimizados, o número de moléculas de DNA alvo inicial pode ser determinado com acurácia e sensibilidade sem precedentes, suficientes para detectar uma única molécula de DNA na reação (KUBISTA *et al.*, 2006).

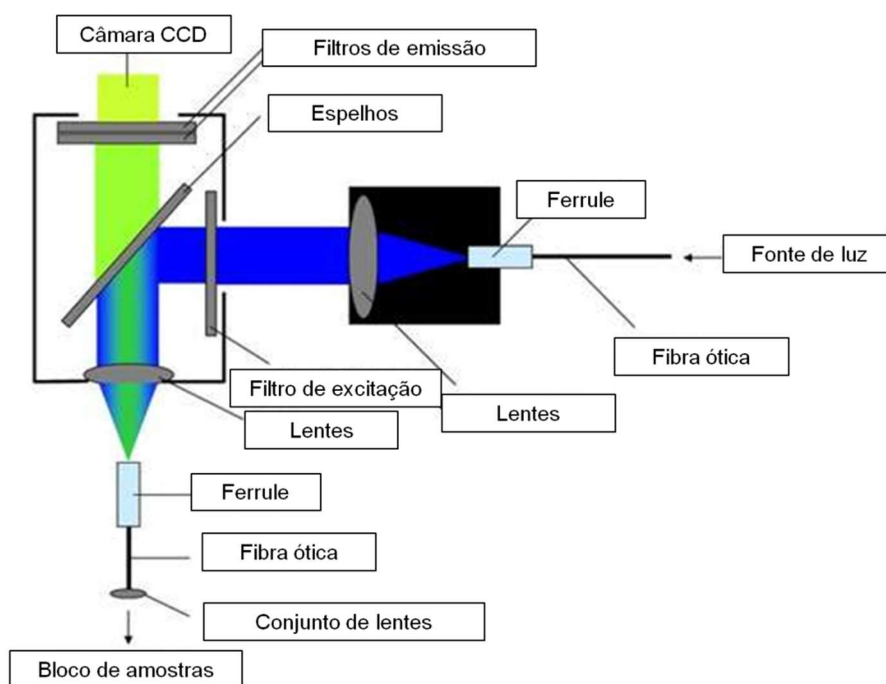


Figura 3 - Sistema óptico de equipamento de PCR em tempo real com excitação por lâmpada halógena. Fonte: Disponível em www.labrepco.com (tradução nossa).

Além dos componentes tradicionais utilizados na PCR convencional – como tampão Tris-HCl, $MgCl_2$, dNTP, iniciadores, *Taq* DNA polimerase – a PCR em tempo real necessita de um sistema para monitoramento da síntese dos novos fragmentos de DNA.

Esse sistema é composto por corantes fluorescentes que se ligam ao produto de PCR formado e reportam sua presença a partir da emissão de fluorescência. Durante os ciclos iniciais da PCR, o sinal fluorescente é fraco e não pode ser distinguido da fluorescência de fundo (*background*). Essa fase da reação de PCR é chamada de *baseline*. À medida que o produto de PCR se acumula, o sinal fluorescente é percebido pelo equipamento, aumentando exponencialmente durante os ciclos intermediários da reação. Em seguida, o nível de sinal é saturado. Essa saturação ocorre em função do consumo ou degradação de alguns componentes críticos para a reação; ou seja, iniciadores, sistema de detecção ou dNTP. Outro componente limitante é o número de moléculas de DNA polimerase, cuja degradação ao longo da ciclagem faz com que a dinâmica exponencial de amplificação que ocorre nas fases inicial e intermediária da reação de PCR seja convertida em dinâmica linear nos ciclos finais (KUBISTA *et al.*, 2006); (WATZINGER *et al.*, 2006).

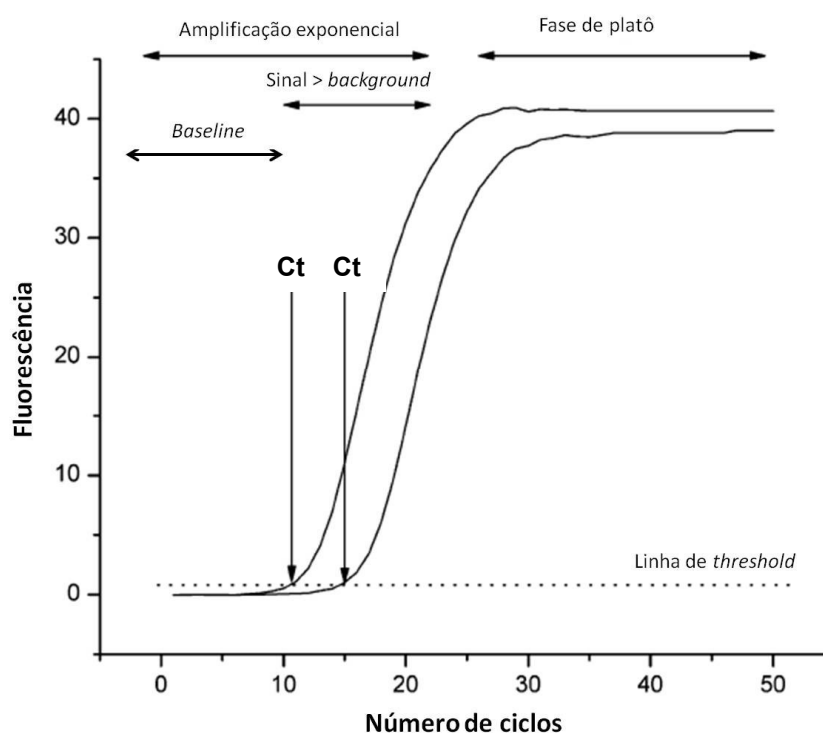


Figura 4 - Etapas de geração das curvas-resposta por PCR em tempo real, em escala linear.

Fonte: Kubista *et al.*, 2006 (tradução nossa).

É importante notar que em um experimento de PCR em tempo real todas as curvas-resposta, ao final da ciclagem, são saturadas no mesmo nível de fluorescência. Isso demonstra que a detecção em ponto final, como ocorre na PCR convencional, não é

informativa quanto à quantidade inicial de moléculas-alvo presente na amostra e permite apenas resultados qualitativos ou semiquantitativos. Por outro lado, as curvas-resposta da PCR em tempo real são monitoradas durante a fase exponencial da reação, o que reflete a diferença na quantidade inicial de moléculas de DNA (WATZINGER *et al.*, 2006). Essa diferença é determinada pela comparação do número de ciclos de amplificação necessários para que as curvas-resposta atinjam um determinado nível de fluorescência (*threshold*). O número de ciclos necessários para atingir o *threshold* é chamado Ct (do inglês *Cycle threshold*), que é o dado utilizado para a quantificação da amostra (Figura 4). Quando representadas em escala logarítmica, é esperado que as curvas de amplificação sejam paralelas durante a fase exponencial da reação, de modo que o ajuste do *threshold* não seja crítico para a quantificação. Assim, a seleção do *threshold* é parcialmente arbitrária e isso não afeta significativamente as diferenças entre os Ct das amostras (KUBISTA *et al.*, 2006).

Em um sistema de PCR cuja eficiência é 100%, a quantidade de produto formado segue a dinâmica de uma progressão geométrica tipo 2^n , em que n é o número de ciclos de amplificação. Num sistema imperfeito, a eficiência do sistema pode ser estimada pela avaliação da amplificação de uma curva-padrão com fator de diluição conhecido (idealmente, 1:10). Os valores de Ct dos padrões diluídos são dispostos em gráfico junto com o logaritmo da concentração inicial da amostra (N_0), número de cópias ou fator de diluição, o que pode ser representado pela equação:

$$Ct = k \times \log(N_0) + Ct(1)$$

A eficiência é calculada através do coeficiente angular obtido por análise de regressão linear dos dados (k) como:

$$E = 10^{\frac{1}{k}} - 1$$

O intercepto-y obtido a partir da regressão linear representa o número de ciclos de PCR necessários para detectar a presença de uma única molécula de DNA na reação, portanto uma representação indireta do limite mínimo de detecção do sistema.

O sistema de PCR em tempo real utiliza exclusivamente fluorescência como método de detecção. Estão disponíveis para uso como *reporter* tanto sondas específicas

quanto corantes inespecíficos. No trabalho inicial de Higuchi e colaboradores (HIGUCHI *et al.*, 1992) foi utilizado como corante o brometo de etídio, que se torna fluorescente a partir da intercalação inespecífica nas moléculas de DNA. Intercaladores clássicos, entretanto, reduzem a eficiência da DNA polimerase e atualmente corantes tipo cianinas assimétricas como SYBR Green I e BOXT0 têm-se tornado populares (ZIPPER *et al.*, 2004; BENGTSSON *et al.*, 2003). Esses corantes não apresentam fluorescência quando estão livres em solução, mas tornam-se fluorescentes quando se ligam ao DNA, presumivelmente na fenda menor da hélice de DNA. Na PCR, a fluorescência desses corantes aumenta proporcionalmente à quantidade de produto formado. Apesar de serem apropriados para PCR em tempo real quantitativa (qPCR), esses corantes geram sinal fluorescente na presença de qualquer DNA dupla-fita, incluindo produtos inespecíficos e *primer-dimers* sendo, portanto, considerados *reporters* não-específicos na reação de PCR em tempo real (WATZINGER *et al.*, 2006). Formatos de detecção baseados na hibridização específica de uma ou duas sondas marcadas com fluoróforos à sequência-alvo específica durante a amplificação são os mais comumente utilizados.

A maioria dos ensaios descritos para a detecção de DNA ou RNA é baseada na utilização de sondas de hidrólise (HOLLAND *et al.*, 1991a; HOLLAND *et al.*, 1991b). Sondas de hidrólise são comumente conhecidas como sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA) ou sondas 5' nuclease. Essas sondas são duplamente marcadas, contendo um fluoróforo *reporter*, como FAM ou VIC, covalentemente ligado à extremidade 5'; e uma molécula *quencher*, como o fluoróforo TAMRA, covalentemente ligado à extremidade 3'. Quando a molécula *reporter* é estimulada por uma fonte de luz a emitir fluorescência, essa energia é absorvida pelo *quencher*, que a usa como estímulo para emitir sua própria fluorescência. Dessa maneira, a fluorescência do *repórter* não é detectada pelo sistema óptico do equipamento. Esse princípio físico é conhecido como FRET (do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (SELVIN, 1995). Essa transferência de energia se dá eficientemente somente em distâncias muito curtas e diminui rapidamente quando o *reporter* e o *quencher* são separados. Durante a PCR, quando a Taq DNA polimerase estende os iniciadores, a sonda hibridizada à fita de DNA é degradada devido à atividade 5' exonuclease da enzima e as moléculas *reporter* e *quencher* são separadas. Isso extingue o FRET e faz com que a fluorescência do *reporter* deixe de ser captada pelo *quencher* e passe a ser detectada pelo sistema óptico do equipamento de PCR em tempo real (Figura 5). Existe uma correlação linear entre o

número de moléculas *reporter* liberadas e a quantidade de produto de PCR formada durante cada ciclo da reação. Essa correlação serve como base para o cálculo do número de cópias da sequência-alvo presente inicialmente na reação (WATZINGER *et al.*, 2006). Atualmente, as sondas TaqMan® são marcadas com moléculas *quencher* não-fluorescentes, como NFQ (*Non-Fluorescent Quencher*) ou BHQ (*Black Hole Quencher*). Esse melhoramento técnico elimina eventuais sobreposições espectrais com a fluorescência do *repórter* (*cross-talk* entre corantes) o que leva à maior acurácia na captação do sinal específico do *reporter* e permite trabalhar com mais moléculas fluorescentes simultaneamente, como no caso de reações *multiplex* (WATZINGER *et al.*, 2006).

Sondas TaqMan® MGB™ são oligonucleotídeos curtos caracterizados pela marcação com moléculas ligantes da fenda menor do DNA na extremidade 3' (MGB™) ou, menos frequentemente, na extremidade 5' (KUTYAVIN *et al.*, 2000). Essa modificação química aumenta a temperatura de *melting* da sonda hibridizada e sua afinidade pelo DNA, facilitando a ligação específica à sequência-alvo através da fenda menor da hélice do DNA (KUBISTA *et al.*, 2006).

As principais vantagens da utilização de sondas TaqMan® são a facilidade para o desenho das sondas e poucas restrições quanto à seleção das sequências-alvo. A utilização de sondas fluorogênicas específicas confere não somente maior especificidade na detecção da sequência-alvo, mas também aumenta a sensibilidade da detecção, que se torna comparável àquela obtida em ensaios de *nested-PCR* ou *Southern Blot*. Outro benefício dos sistemas baseados em sondas de detecção é a possibilidade de combinar duas ou mais sondas com diferentes marcações fluorescentes em uma única reação de PCR (*multiplex PCR*). Entretanto, é necessário que os produtos de PCR gerados sejam pequenos (80 a 130 pb) para obter eficiência máxima no processo de amplificação.

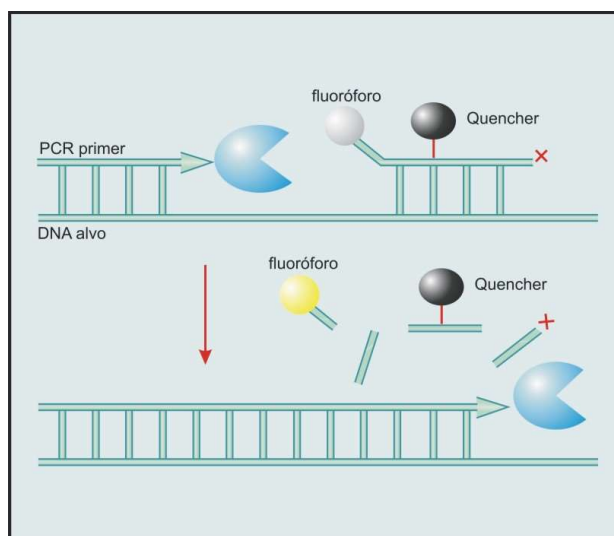


Figura 5 – Sistema de monitoramento de PCR em tempo real por sonda de hidrólise.

Fonte: (DUARTE, 2009).

Outros sistemas de detecção frequentemente utilizados em PCR em tempo real são sondas de hibridização ou *Hyb-Probes* (CAPLIN *et al.*, 1999), *molecular beacons* (TYAGI & KRAMER, 1996), *scorpion primers* (WHITCOMBE *et al.*, 1999) e *LUX primers* (NAZARENKO *et al.*, 2002).

O uso de técnicas moleculares como a PCR tornou possível pesquisar o material genético de *Leptospira* em diversas amostras clínicas, como sangue total, soro, LCR, humor aquoso, tecidos e urina (LEVETT, 2007; 2001). Os alvos moleculares mais comumente pesquisados nos primeiros sistemas descritos eram os genes 16S e 23S rRNA (MERIEN *et al.*, 1992), elementos de inserção (IS) (BOURSAUX-EUDE *et al.*, 1995; ZUERNER *et al.*, 1995) e sequências cujos produtos tinham função desconhecida, derivadas de bibliotecas genômicas (KEE *et al.*, 1994; GRAVEKAMP *et al.*, 1993). A publicação dos genomas completos de *L. interrogans* sorovar Lai (REN *et al.*, 2003) e *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO *et al.*, 2004) e, mais tarde, de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (BULACH *et al.*, 2006) e *L. biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU *et al.*, 2008), impulsionou os estudos de genética evolutiva e comparativa, revelando alvos moleculares mais apropriados para os testes diagnósticos. Entre os novos alvos para os testes moleculares estão os genes codificadores de proteínas características do gênero *Leptospira* como a família Lig (PALANIAPPAN *et al.*, 2005) ou exclusivas das espécies patogênicas, como a lipoproteína LipL32 (GUERREIRO *et al.*, 2001; HAAKE *et al.*, 2000).

Há inúmeros sistemas de PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leptospira* descritos na literatura (AHMED *et al.*, 2009; STODDARD *et al.*, 2009; ROCZEK *et al.*, 2008; SLACK *et al.*, 2007; MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005; SMYTHE *et al.*, 2002). Alguns desses métodos foram validados em amostras clínicas de soro e sangue total humano (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2009; BLACKSELL *et al.*, 2006; MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005; SMYTHE *et al.*, 2002), mas o número de pacientes e grupos-controle testados foi limitado. Do mesmo modo, grande parte dos indivíduos recrutados nesses estudos foi proveniente de áreas de baixa prevalência, tornando necessárias validações com pacientes de regiões endêmicas para avaliar a real aplicabilidade diagnóstica dessas técnicas.

2.7 SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

As leptospiros possuem parede celular e ribossomos, o que as torna teoricamente suscetíveis a várias classes de antimicrobianos. São suscetíveis a β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e carbapenêmicos (AHMAD *et al.*, 2005; HOSPENTHAL & MURRAY, 2003; LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999). Vale ressaltar que as leptospiros não são sensíveis a cloranfenicol, sulfonamidas, rifampicina e metronidazol (FAUCHER *et al.*, 2004; FAINE *et al.*, 1999). Limitações como o longo tempo de geração, necessidade de cultivo em meio suplementado e dificuldades para quantificar o crescimento bacteriano dificultam o desenvolvimento de testes padronizados de suscetibilidade a antimicrobianos (AHMAD *et al.*, 2005; LEVETT, 2001).

2.8 MEDIDAS PREVENTIVAS

2.8.1 Vacinas

A eficácia do uso de vacinas para a prevenção da leptospirose foi demonstrada logo após a comprovação de que as bactérias do gênero *Leptospira* eram o agente causador da doença. As primeiras vacinas foram produzidas na década de 1920 a partir

de bactérias íntegras inativadas por tratamento com formalina (FAINE *et al.*, 1999). Apesar de a vacinação apresentar potencial de uso como método de prevenção em comunidades ou situações de alto risco, a resposta imune gerada pelas vacinas disponíveis (do tipo bacterina) se deve à fração LPS da membrana externa bacteriana. Uma vez que já foram identificados mais de 250 sorovares de *Leptospira*, a eficácia dessas vacinas é limitada. Além disso, bacterinas produzem uma ampla gama de reações adversas e efeitos colaterais. Entretanto, vacinas do tipo bacterina estão aprovadas para uso em humanos no Japão, China (CHEN, 1985), Cuba (MARTÍNEZ *et al.*, 2004) e França (FÉLIX *et al.*, 2011). No Brasil, não há vacinas aprovadas para uso humano.

Desse modo, têm-se tentado identificar novos alvos imunogênicos que induzam imunoproteção cruzada contra os sorovares patogênicos, causando menos efeitos colaterais (FÉLIX *et al.*, 2011). Novas abordagens biotecnológicas como o uso de construções (SEIXAS *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2004) e moléculas recombinantes (FAISAL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2007), vetores virais (BRANGER *et al.*, 2005) e identificação de alvos por ferramentas genômicas (GAMBERINI *et al.*, 2005) e proteômicas (ATZINGEN *et al.*, 2010) levaram a alguns potenciais candidatos vacinais, testados em modelos animais. Nenhum desses protótipos, entretanto, está disponível para uso em humanos.

2.8.2 Medidas não-vacinais

Não há medidas de prevenção de curto prazo que possam ser implantadas com sucesso em áreas hiperendêmicas como as favelas. Como as evidências apontam os ratos domésticos (*R. rattus* e *R. norvegicus*) como os reservatórios primários nas comunidades negligenciadas urbanas (DE MASI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2000), canais de esgoto a céu aberto, drenagem pluvial inadequada e o lixo doméstico acumulado acabam servindo como as principais fontes de contaminação (REIS *et al.*, 2008; KO *et al.*, 1999). O controle químico de roedores tem sido empregado em algumas áreas, mas é uma medida de alto custo e difícil de ser sustentada em médio e longo prazo (DE MASI *et al.*, 2009). O uso de botas, luvas e demais barreiras físicas de proteção diminuem a incidência de lesões que serviriam como porta de entrada para as leptospiros e demonstraram relevância em situações de risco ocupacional quando associados à

antibioticoprofilaxia (ULLMANN & LANGONI, 2011; ZACARIAS *et al.*, 2008). Entretanto, são medidas de adoção inviável a nível populacional. Desse modo, a adequação da estrutura sanitária disponível nas áreas negligenciadas seria a solução ideal e definitiva para o controle e a prevenção da leptospirose urbana, mas é improvável que seja disponibilizada para a população de risco em curto e médio prazo.

2.9 MONITORAMENTO DO RISCO AMBIENTAL

Apesar do mecanismo de veiculação hídrica da leptospirose estar sedimentado na literatura, poucos estudos foram conduzidos até o momento com o intuito de determinar o risco ambiental relacionado à leptospirose humana. A principal limitação encontrada é técnica, pois as leptospirosas saprofíticas são comumente encontradas em amostras ambientais de água e solo úmido. As condições de isolamento e cultivo *in vitro* a partir de amostras ambientais permitem o crescimento tanto de espécies saprofíticas quanto patogênicas, mas devido à competição por nutrientes e características metabólicas, o isolamento de espécies patogênicas é bastante prejudicado nessa circunstância (FAINE *et al.*, 1999). Alguns estudos utilizaram técnicas moleculares na avaliação de amostras ambientais (VIAU & BOEHM, 2011; VITAL-BRAZIL *et al.*, 2010; AVIAT *et al.*, 2009; LUCHINI *et al.*, 2008; GANOZA *et al.*, 2006; GANOZA & VINETZ, 2006; TANSUPHARISI *et al.*, 2006), mas as mesmas também apresentaram limitações. As principais estão relacionadas à remoção de moléculas derivadas da biodegradação de matéria orgânica, principalmente compostos húmicos - ácidos húmico e fúlvico (LLOYD *et al.*, 2010). Essas moléculas formam complexos com íons divalentes e alguns metais pesados potencialmente presentes em amostras ambientais, formando compostos de difícil remoção durante o processo de extração de DNA. Assim, é necessário otimizar extensivamente as técnicas de extração, ou mesmo utilizar métodos especificamente desenvolvidos para essas matrizes biológicas (BRAID *et al.*, 2003). Muitas vezes, a quantidade de matéria orgânica presente em amostras ambientais de água e solo é grande o suficiente para limitar o volume inicial de amostra a ser usado nas análises. Tendo em vista que a concentração bacteriana nessas matrizes não é maciça, a limitação do volume inicial muitas vezes pode comprometer a sensibilidade analítica da técnica (LLOYD *et al.*, 2010). Mesmo com o emprego de métodos de extração de DNA

apropriados, nem sempre é possível eliminar completamente os complexos húmicos, que acabam sendo eluídos juntamente com o DNA extraído (TANSUPHARISI *et al.*, 2006). Como esses complexos atuam como fortes inibidores da *Taq* DNA polimerase (ZHANG *et al.*, 2010; KERMEKCHIEV *et al.*, 2009; WILSON, 1997), os resultados da PCR se tornam pouco confiáveis ou reprodutíveis. Desse modo, é mandatório que as técnicas moleculares incluam mecanismos para o monitoramento de eventuais perdas e inibição, seja durante o processo de concentração das amostras, extração do DNA ou amplificação. Algumas alternativas seriam o uso de um controle interno homólogo extrínseco (avaliação de alíquotas de amostra contaminadas artificialmente com quantidades conhecidas de *Leptospira* e avaliadas em paralelo com alíquotas não contaminadas), ou uso de um controle interno heterólogo extrínseco - contaminação das amostras com quantidade conhecida de plasmídeo (BURD, 2010; BEHETS *et al.*, 2007). Infelizmente, nenhum dos métodos descritos na literatura até o momento utiliza estes recursos em sua metodologia.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

A detecção precoce e quantitativa de leptospiras em amostras de pacientes com suspeita clínica de leptospirose através de técnicas moleculares como a PCR em tempo real pode oferecer um diagnóstico diferencial rápido e precoce frente a outras doenças íctero-febris agudas. Como já foi demonstrado que a detecção quantitativa da carga bacteriana tem associação estatística significativa com o desfecho clínico em pacientes com leptospirose, a disponibilização de um método diagnóstico quantitativo traria subsídios para a instituição precoce de condutas terapêuticas e de suporte específicas. Com isso, seria possível reduzir a mortalidade, a intensidade e os danos potencialmente provocados pela evolução clínica da doença, além de diminuir os dias de internamento e os custos associados.

A extrapolação do uso do método molecular quantitativo para a esfera ambiental permitiria estabelecer com precisão os potenciais focos de infecção, o que é fundamental para o monitoramento epidemiológico da doença e para a elaboração de políticas públicas efetivas que objetivem a contenção do ciclo de transmissão urbana da leptospirose.

3.2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a PCR em tempo real como ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento de pacientes com leptospirose; e sua potencial aplicabilidade ao monitoramento da contaminação ambiental a partir da análise de amostras de água.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- A. Avaliar o desempenho diagnóstico da PCR em tempo real frente aos métodos padrão-ouro – MAT e cultura microbiológica – utilizando amostras de sangue total em EDTA e soro de pacientes com suspeita clínica de leptospirose;

- B. Determinar fatores de risco independentemente associados ao desenvolvimento de Síndrome de Hemorragia Pulmonar e óbito por leptospirose;
- C. Avaliar a correlação entre carga bacteriana e desfecho clínico em casos confirmados de leptospirose;
- D. Otimizar parâmetros analíticos para permitir a quantificação de leptospiras patogênicas em diferentes matrizes de água ambiental;
- E. Validar o método de PCR em tempo real para o monitoramento da contaminação ambiental por espécies patogênicas de *Leptospira* em amostras de água coletadas em área hiperendêmica.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo das etapas do estudo desenvolvidas a partir de pesquisa em seres humanos foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, sob protocolo CAAE 0046.1.208.000-09 (Anexo 1). Com a autorização do Comitê de Ética, os prontuários clínicos dos pacientes foram revisados para coleta de dados demográficos e laboratoriais. A coleta de dados foi realizada utilizando formulários padronizados (Anexos 2 e 3). Os dados coletados foram armazenados em bancos de dados digitais, protegidos por senha e com acesso limitado à equipe envolvida no estudo.

4.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA

4.1.1 Casuística

Foram incluídos nessa etapa do estudo os pacientes com sintomatologia clínica compatível com leptospirose, atendidos pela equipe médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR); ou das Unidades de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba; ou do Hospital Couto Maia em Salvador, entre os meses de outubro de 2007 e julho de 2009.

O critério de inclusão foi baseado na suspeita clínica de leptospirose conforme achados laboratoriais específicos ou identificação de manifestações características da leptospirose no momento do primeiro atendimento aos pacientes; i.e., sufusão conjuntival; icterícia e aumento mínimo de 2× nos níveis de transaminases; icterícia e aumento nos níveis séricos de creatinina e/ou uréia (KO *et al.*, 1999).

Foram selecionados 150 pacientes com suspeita clínica de leptospirose. Desses, 127 pacientes foram laboratorialmente confirmados (85 provenientes de Salvador; 42 provenientes de Curitiba) e 23 pacientes não foram confirmados (14 provenientes de

Salvador; nove provenientes de Curitiba). Além dos casos com suspeita clínica de leptospirose, foram selecionados 122 controles patológicos (65 provenientes de Salvador; 57 provenientes de Curitiba), nos quais houve confirmação laboratorial de outra doença febril aguda que não leptospirose; e 60 doadores de sangue provenientes de Curitiba.

4.1.2 Amostras biológicas

No momento da apresentação clínica ou do internamento, foram colhidas amostras de soro (para os testes sorológicos e moleculares), sangue total em EDTA (para os testes moleculares) e amostras de sangue sem anticoagulante (para a hemocultura) dos pacientes suspeitos e dos controles patológicos. Essas amostras foram tratadas como amostras agudas, independentemente de há quantos dias o paciente apresentava sintomas. Sempre que possível, uma amostra convalescente de soro (obtida no mínimo sete dias após a coleta da amostra aguda) foi coletada dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose para avaliação pelo MAT. As amostras de sangue total em EDTA e soro dos doadores de sangue foram coletadas no momento da apresentação voluntária para doação. As amostras de soro foram utilizadas para pesquisa de anticorpos contra os seguintes patógenos: HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTVL-2, VHB, VHC, *Treponema pallidum*, *Trypanossoma cruzi*. Os testes foram realizados pelo Laboratório do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR.

4.1.3 Isolamento de *Leptospira* a partir de hemocultura

A hemocultura foi realizada apenas para os pacientes selecionados em Salvador. Logo após a internação e antes do início da antibioticoterapia, duas gotas de sangue recém-coletado foram inoculadas em tubos contendo dois mL de meio EMJH líquido ou semissólido. Os tubos inoculados foram encaminhados ao laboratório, onde foram incubados a 30°C e inspecionados por microscopia em campo escuro semanalmente por três meses, período após o qual as amostras negativas foram descartadas. O diagnóstico

laboratorial de leptospirose foi confirmado quando houve crescimento e visualização microscópica de bactéria morfológicamente compatível com *Leptospira*.

4.1.4 MAT

Todas as amostras de soro agudas e convalescentes foram submetidas ao MAT. O MAT foi realizado seguindo o procedimento recomendado pela Organização Mundial da Saúde (TERPSTRA, 2003) e utilizando para triagem a bateria reduzida de cepas descrita na Tabela 2. Essa bateria de cepas foi utilizada, pois estudos anteriores conduzidos no Brasil demonstraram que as reações de aglutinação em amostras clínicas são direcionadas contra cepas de sorogrupos específicos (MCBRIDE *et al.*, 2007a). As amostras de soro foram diluídas 1:50 em tampão PBS 1× e testadas frente a cada um dos antígenos. Após incubação, foi feita a observação microscópica em campo escuro, para detectar a formação de aglutinação. Nos casos em que houve aglutinação de mais de 50% das bactérias por campo microscópico, o soro foi diluído seriadamente 1:2, iniciando em 1:50 e prosseguindo até 1:6.400 para a titulação dos anticorpos. O título foi determinado a partir da diluição em que houve aglutinação mínima de 50% das bactérias por campo microscópico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; LEVETT, 2001).

Tabela 2 - Cepas de *Leptospira* utilizadas na execução do MAT.

Genomoespécie	Sorovar	Cepa
<i>Leptospira interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
	Canicola	Hond Utrecht IV
	Copenhageni	M20
	Copenhageni	L1-130
<i>Leptospira biflexa</i>	Patoc	Patoc 1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Ballum	Mus 127
<i>Leptospira kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V

Fonte: (TERPSTRA, 2003).

Foram considerados confirmados os casos em que as amostras agudas apresentaram título de reatividade ≥ 800 . Nas situações em que houve disponibilidade de

amostra convalescente de soro para análise, foram empregados os seguintes critérios de confirmação: soroconversão entre a amostra aguda e a amostra convalescente (resultado não reagente na amostra aguda; resultado reagente na amostra convalescente, independentemente do título de reatividade); ou aumento mínimo de 4× no título de reatividade entre as amostra aguda e convalescente.

Pacientes cujas amostras agudas apresentaram título de reatividade ≥ 100 e < 800 e sem disponibilidade de amostra convalescente foram considerados casos suspeitos, mas não confirmados.

4.1.5 Experimentos de contaminação *in vitro* para padronização da qPCR

Foram realizados quatro experimentos independentes de contaminação *in vitro* (*spiking*) utilizando *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130. Para cada experimento, a concentração de culturas inoculadas em meio líquido EMJH há sete dias e em fase logarítmica de crescimento foi determinada. Quatro mililitros de cultivo em meio líquido foram concentrados por centrifugação a 1.500×g por 15 min. O sobrenadante foi descartado, o *sedimento* foi lavado duas vezes com 1 mL com PBS 1× (pH 7,2) e ressuspenso em 1,5 mL de PBS 1×. O volume final foi dividido em três alíquotas de 500 µL. Após diluição 1:100 em PBS 1×, as bactérias foram contadas três vezes em cada alíquota usando uma câmara de contagem de Petroff-Hausser e seguindo as instruções do fabricante. A média das três contagens foi considerada para os experimentos de *spiking*.

Para cada experimento, amostras de sangue total coletadas em EDTA e sangue sem anticoagulante (coletadas em tubos SST) foram obtidas de um doador voluntário sadio e sem evidências sorológicas de infecção por *Leptospira*. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue e uma alíquota de água ultrapura foram artificialmente contaminadas com quantidade suficiente de *L. interrogans* para atingir uma concentração de 1×10^6 leptospiros/mL. Após a retração do coágulo, os tubos SST artificialmente contaminados foram centrifugados a 1.500×g por 15 min para a obtenção do soro. As amostras de sangue em EDTA, soro e água ultrapura foram diluídas 1:10 nas respectivas matrizes, num volume final de 1,5 mL, até a concentração de 1 *Leptospira*/mL. Alíquotas

não contaminadas de sangue em EDTA, soro e água ultrapura foram usadas como controles negativos nos experimentos.

4.1.6 Extração de DNA

Para a avaliação dos desempenhos analítico e diagnóstico do método de PCR em tempo real, a extração do DNA das amostras de sangue total coletado em EDTA, soro, água e cultura foi realizada utilizando o kit comercial QIAGEN DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), seguindo as orientações do fabricante com algumas modificações (Figura 6). Resumidamente, 200 µL de amostra foram acrescidos de 20 µL de Proteinase K e 200 µL de tampão AL. A mistura foi homogeneizada e incubada a 56 °C por 10 min. Após breve centrifugação a 6.000×g, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto com subsequente homogeneização e centrifugação breve a 6.000×g. A mistura foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada a 6.000×g por um min. Após descarte do sobrenadante e reposicionamento da coluna sobre um novo tubo coletor, foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem AW1. Após centrifugação e descarte do filtrado, foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem AW2. Após descarte do filtrado e encaixe no tubo coletor, a coluna foi centrifugada a 10.000×g por três min. A coluna foi transferida para um microtubo e foram adicionados 100 µL de tampão de eluição. Após incubação a temperatura ambiente (TA) por 10 min, a coluna foi centrifugada a 6.000×g por um min para recuperação do DNA extraído.



Figura 6 – Procedimento de extração de DNA genômico utilizando o kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit.

Fonte: (QIAGEN, 2006), adaptado pela Autora.

4.1.7 Construção da curva de calibração

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa L1-130 foi inoculada em 50 mL de meio EMJH líquido. Após crescimento por sete dias, a cultura foi dividida em dez alíquotas de 5 mL. Cada alíquota foi concentrada por centrifugação a 1.500×g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *sedimento* foi lavado duas vezes com 1 mL com PBS 1× (pH 7,2). Após ressuspensão em 200 μ L de PBS 1×, cada alíquota foi submetida à extração de DNA conforme detalhado no item 4.1.6. Após a unificação e homogeneização do DNA genômico obtido das dez alíquotas, o mesmo foi quantificado usando o espectrofotômetro ND-1000 Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Após a quantificação, o DNA foi novamente dividido em alíquotas de 50 μ L, armazenadas a -80°C para posterior processamento.

Para a construção da curva-padrão, o número de equivalentes de genoma (GEq) foi calculado com base num genoma de 4.627 Mb (NASCIMENTO *et al.*, 2004), na

adoção da massa de cada nucleotídeo como $1,096 \times 10^{-21}$ g e na presença de cópia única do gene *lipL32* no genoma bacteriano. Oito calibradores foram preparados por ajuste da concentração de uma alíquota de DNA genômico para 2×10^9 GEq/mL (1×10^7 GEq/5 μ L) e posterior diluição 1:10 até 2×10^2 GEq/mL (1×10^0 GEq/5 μ L). Cada lote da curva-padrão foi preparado num volume final de 500 μ L, fracionado em alíquotas de 100 μ L e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.1.8 Pesquisa do gene RPP30

O gene constitutivo RPP30, que codifica a subunidade p30 (30 kDa) da ribonuclease P humana, foi utilizado como controle interno heterólogo intrínseco nos processos de extração de DNA e PCR. Oligonucleotídeos, cujas sequências foram previamente publicadas (STODDARD *et al.*, 2009) e estão representadas na Tabela 3, foram utilizados para amplificar parcialmente o gene, gerando um fragmento de 80 pb. A mistura de reação consistiu de 12,5 μ L de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 200 nM dos iniciadores senso e anti-senso, 100 nM de sonda, 5 μ L de DNA extraído (ou água ultrapura, no caso de controle negativos de DNA). O volume final da reação foi ajustado para 25 μ L com água ultrapura. As reações de PCR em tempo real foram realizadas usando o equipamento ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). O protocolo de amplificação consistiu de 2 min a 50°C e 10 min a 95°C , seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento e extensão a 60°C por 1 min (STODDARD *et al.*, 2009).

O resultado da amplificação parcial do gene RPP30 foi utilizado para validar o resultado obtido na amplificação parcial do gene *lipL32* (descrita abaixo). Após análise do perfil multicomponente para emissão de fluorescência, foram considerados válidos os resultados de amostras de sangue total quando a amplificação parcial do gene RPP30 resultou em Ct igual ou menor a 25, e em Ct menor ou igual a 35 para amostras de soro.

4.1.9 Detecção do gene *lipL32*

Para a amplificação parcial do gene *lipL32*, presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira*, foram utilizados oligonucleotídeos previamente descritos (STODDARD *et al.*, 2009), cujas sequências estão apresentadas na Tabela 3. As misturas de reação consistiram de 12,5 µL de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA), 500 nM dos iniciadores senso e anti-senso, 100 nM de sonda, 5 µL de DNA (ou água ultrapura, no caso de controles negativos de DNA), com ajuste do volume final para 25 µL com água ultrapura. O protocolo de amplificação utilizado foi idêntico ao descrito no item 4.1.8 para amplificação parcial do gene RPP30.

Todas as amostras foram amplificadas em duplicata e um controle negativo de DNA (NTC) foi incluído a cada cinco amostras em todas as corridas.

Para a interpretação dos resultados, o *threshold* foi fixado em 19.300 e foi considerada a média de Ct das duas replicatas técnicas de cada amostra. Após análise do perfil multicomponente para emissão de fluorescência, amostras cujas replicatas foram detectadas com Ct menor ou igual a 40 foram consideradas positivas. Aquelas cujas replicatas não foram detectadas foram consideradas negativas. No caso de inconsistências (uma replicata positiva e outra negativa) ou no caso de as duas replicatas terem sido detectadas com Ct maior do que 40, a PCR foi repetida e os critérios anteriores foram usados para interpretação. No caso de persistência dos resultados duvidosos após a repetição, a amostra foi considerada positiva usando a média das replicatas positivas como resultado, independentemente do Ct.

Tabela 3 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para detectar os genes *lipL32* e RPP30.

Ensaio	Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')
<i>lipL32</i>	LipL32-45F	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG
	LipL32-286R	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT
	LipL32-189P	FAM - AAA GCC AGG ACA AGC GCC G - BHQ1
RPP30	RNaseP3F	CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG
	RNaseP3R	TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG
	RNaseP3	FAM - CCC CAG TCT CTG TCA GCA CTC CCT TC - BHQ1

4.1.10 Ensaios para validação analítica do método diagnóstico

Para a validação analítica do método diagnóstico baseado em PCR em tempo real, foram utilizados os conceitos previamente preconizados (BUSTIN *et al.*, 2009). Apesar de a avaliação dos resultados ter levado em consideração os resultados qualitativos do teste nessa etapa do estudo, a validação do método foi conduzida seguindo os parâmetros analíticos recomendados por Burd (BURD, 2010). Essa abordagem foi empregada para permitir o uso dos resultados quantitativos na etapa seguinte do estudo sem a necessidade de realizar nova validação analítica. Os desenhos experimentais foram adaptados quando necessário.

4.1.10.1. Determinação da eficiência da amplificação e intervalo de linearidade

Resultados da amplificação de um único lote da curva-padrão contendo os oito calibradores testados em duplicata em 22 ensaios independentes conduzidos em condições experimentais semelhantes (mesmo laboratório, mesmo equipamento, mesmo operador), realizados conforme descrito no item 4.1.9, foram usados para avaliar a eficiência e o intervalo de linearidade do método de amplificação parcial do gene *lipL32* por PCR em tempo real.

Para avaliação do intervalo de linearidade, o logaritmo da concentração de leptospiros (GEq/mL) foi plotada contra a média dos resultados de Ct obtidos para cada um dos oito calibradores, com subsequente análise de regressão linear dos dados e avaliação dos parâmetros matemáticos da linha de regressão resultante.

A eficiência do sistema de amplificação foi calculada a partir do coeficiente angular da reta, seguindo a equação:

$$E = 10^{-\frac{1}{k}} - 1, \text{ sendo } k \text{ o coeficiente angular da reta.}$$

4.1.10.2. Avaliação da acurácia e determinação do efeito da matriz biológica

Uma vez que não existem amostras-padrão ou testes moleculares quantitativos comerciais para quantificação de leptospiros, a acurácia do método foi verificada por comparação entre a quantidade nominal de leptospiros utilizada para contaminar artificialmente as amostras nos experimentos de *spiking* (leptospiros contadas microscopicamente) e a quantificação obtida através da PCR em tempo real (qPCR). Para essa análise, utilizou-se o método de regressão linear.

A mesma abordagem analítica foi utilizada para estimar o efeito de cada matriz biológica (sangue total em EDTA e soro, em comparação com água ultrapura) sobre a quantificação final de leptospiros, utilizando os dados obtidos nos experimentos de contaminação *in vitro*. Após a análise de regressão linear, os parâmetros matemáticos das linhas de regressão obtidas para cada matriz biológica foram comparados para determinar o efeito de matriz.

4.1.10.3. Avaliação da precisão

A precisão do método foi determinada através de análises de variação intraensaio (repetibilidade) e interensaio (reprodutibilidade). Para essas análises, um novo lote da curva-padrão (lote 2) foi produzido conforme descrito no item 4.1.7 e quantificado por qPCR utilizando como referência os calibradores do primeiro lote da curva-padrão produzida (lote 1).

Para o ensaio de repetibilidade, foram realizadas 10 replicatas técnicas de cada um dos oito padrões do lote 2 da curva-padrão (1×10^7 a $1 \text{ GEq}/5\mu\text{L}$), amplificados simultaneamente às duplicatas técnicas de cada um dos oito calibradores do lote 1 da curva-padrão, numa mesma corrida de PCR.

Para o ensaio de reprodutibilidade, os oito pontos do lote 1 e do lote 2 da curva-padrão foram amplificados em duplicata em 32 experimentos independentes, realizados conforme descrito no item 4.1.10. Todos os experimentos foram conduzidos pelo mesmo operador, sendo 22 ensaios realizados na Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, e 10 realizados no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, no Centro de Pesquisas

Gonçalo Moniz em Salvador, Bahia. Exceto pelas curvas-padrão, foram utilizados lotes diferentes de reagentes para os experimentos conduzidos nos dois laboratórios.

As médias dos dados de Ct e do logaritmo da concentração obtidas a partir da quantificação por qPCR dos padrões do segundo lote da curva-padrão foram utilizadas nas análises. O limite mínimo de quantificação (LMQ) foi determinado para variação máxima de 30% em relação à média da quantificação da concentração nominal de DNA dos padrões.

4.1.10.4. Avaliação da sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do método foi estabelecida através da determinação do limite mínimo de detecção (LMD). O DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130, quantificado conforme descrito no item 4.1.7, foi utilizado para produzir padrões de DNA com as seguintes concentrações: 20, 10, 7, 5, 4, 3, 2 e 1 GEq/mL. Cada um dos padrões foi amplificado 24 vezes, em duas reações de PCR realizadas no mesmo dia, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e reativos dos mesmos lotes. Os resultados obtidos foram usados para estimar o LMD com *hit-rate* de 95%.

4.1.10.5. Avaliação da especificidade analítica

A especificidade analítica é dependente do desenho dos oligonucleotídeos usados no ensaio. Uma vez que não foram feitos ajustes ao desenho dos oligonucleotídeos em relação às sequências publicadas anteriormente (STODDARD *et al.*, 2009), os testes de especificidade analítica descritos na publicação foram aceitos para fins dessa validação.

4.1.11 Avaliação do desempenho diagnóstico do método

Sensibilidade e especificidade clínica (ou diagnóstica) e os valores preditivo positivo e preditivo negativo do método foram determinados a partir da comparação dos resultados qualitativos de PCR em tempo real com o resultado laboratorial final obtido pela análise conjunta dos métodos sorológico e microbiológico para os pacientes incluídos nessa etapa do estudo (150 casos suspeitos de leptospirose, 122 controles patológicos e 60 indivíduos saudáveis). Todos os parâmetros foram avaliados tanto para análise de amostras de sangue total em EDTA quanto para amostras de soro.

4.1.12 Análises estatísticas

Análise de regressão probit (PASW Statistics for Windows v. 18, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) foi usada para estimar o LMD com *hit-rate* de 95%. Análises de regressão linear foram utilizadas nas avaliações de eficiência, linearidade e acurácia. A comparação entre os coeficientes angulares e os interceptos-y de diferentes linhas de regressão foi realizada por análise de covariância (ANCOVA). O teste t de Student não-pareado foi usado para avaliar a significância estatística da diferença entre os valores das médias quando duas variáveis paramétricas independentes foram comparadas. Para analisar a diferença entre as médias de mais de duas variáveis paramétricas independentes foi usada análise de variância (ANOVA) univariada seguida do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Para essas análises, foi utilizado o software GraphPad Prism (Prism v. 5.03 for Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foi assumida significância estatística para valores de $P < 0,05$.

4.2 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE CARGA BACTERIANA E DESFECHO CLÍNICO EM CASOS DE LEPTOSPIROSE

4.2.1 Casuística

Para essa etapa do estudo foram selecionados apenas pacientes com confirmação laboratorial de leptospirose, admitidos para internação no Hospital Couto Maia, em Salvador (BA), no período entre 30 de abril de 2008 e 20 de setembro de 2011. Dos 385 pacientes com suspeita clínica, foi coletada amostra de sangue total em EDTA de 296 pacientes confirmados (item 4.2.3), dos quais 280 foram testados por qPCR e incluídos no estudo.

Os desfechos clínicos analisados foram óbito e LPHS. As definições clínicas empregadas no estudo foram:

- A. Estado mental alterado: paciente sem alteração, confuso, letárgico ou em coma à avaliação do estado mental;
- B. Febre: temperatura axilar superior a 37,5°C;
- C. Hemoptise: expectoração sanguínea devido a sangramento proveniente das vias aéreas inferiores. Aferida visualmente;
- D. Hipotensão: tensão arterial sistólica inferior a 90 mmHg;
- E. Icterícia: coloração amarelada da pele e mucosas em decorrência da hiperbilirrubinemia. Aferida visualmente;
- F. Insuficiência respiratória: frequência respiratória superior a 28 ipm ou dispneia;
- G. Insuficiência renal aguda: ureia >100 mg/dL e/ou creatinina sérica >2,0 mg/dL;
- H. LPHS: hemorragia pulmonar maciça associada à insuficiência pulmonar (uso de O₂ ou ventilação mecânica);
- I. Oligúria: diurese inferior a 400 mL/dia;

4.2.2 Amostras biológicas

No momento do internamento e antes da instituição da antibioticoterapia, foram colhidas amostras agudas de soro (para os testes sorológicos), sangue total em EDTA (para os testes moleculares) e de sangue sem anticoagulante (para a hemocultura).

Sempre que possível, uma amostra convalescente de soro foi coletada com intervalo mínimo de sete dias para avaliação pelo MAT.

4.2.3 Confirmação laboratorial

Para confirmação laboratorial, amostras de sangue sem anticoagulante foram usadas para inocular tubos contendo meio EMJH, seguindo protocolo e critérios de confirmação descritos no item 4.1.3. Todas as amostras de soro provenientes de infecções agudas e convalescentes foram submetidas ao MAT conforme detalhado no item 4.1.4. Amostras de sangue total foram submetidas à extração de DNA (descrito abaixo) e amplificação parcial dos genes RPP30 e *lipL32* seguindo os protocolos e critérios de interpretação descritos nos itens 4.1.8 e 4.1.9.

Os critérios utilizados para confirmação laboratorial foram:

- A. Amostra de soro de infecção aguda com título de reatividade ≥ 800 no MAT, ou;
- B. Soroconversão entre amostra aguda e convalescente (negativo para 100), ou;
- C. Aumento mínimo de 4 \times no título de reatividade entre a amostra aguda e a amostra convalescente, ou;
- D. Crescimento de bactéria morfológicamente compatível com *Leptospira* na hemocultura;
- E. Detecção do gene *lipL32* em amostras de sangue total.

4.2.4 Extração de DNA

Para a avaliação da relação entre carga bacteriana e desfecho clínico, a extração do DNA das amostras de sangue total coletado em EDTA foi realizada utilizando o kit comercial NucliSENS® Magnetic Extration Reagents (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands) na plataforma automatizada NucliSENS® EasyMag (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands). A extração foi realizada a partir de 100 μ L de amostra, processada

utilizando o protocolo *Specific B* do equipamento, com lise por 10 min e adição de 50 μ L de sílica magnetizada em processo *offboard*, com posterior carregamento do equipamento para extração do DNA, que foi eluído em 50 μ L de tampão de eluição.

4.2.5 Construção da curva de calibração

A curva de calibração foi construída conforme procedimento detalhado no item 4.1.7.

4.2.6 Quantificação do DNA bacteriano por qPCR

As amplificações parciais dos genes RPP30 e *lipL32* foram realizadas conforme descrito nos itens 4.1.8 e 4.1.9, exceto pela substituição da Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA) pela TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). A partir dos dados obtidos por amplificação dos oito calibradores, o software efetuou análise de regressão linear do logaritmo da concentração contra a média de Ct para cada calibrador. Os resultados de Ct de cada amostra foram interpolados na linha de regressão para a quantificação. Foi considerada a média de quantificação do gene *lipL32* em cada amostra.

Como a concentração dos padrões foi ajustada para 5 μ L (ou seja, para cada reação de PCR), foi necessário corrigir a unidade de quantificação final das amostras de GEq/5 μ L de DNA para GEq/ml de sangue total. Essa conversão foi feita utilizando o fator de correção $\times 100$, deduzido da seguinte maneira:

- A. 5 μ L de DNA _____ $1\times$
50 μ L de DNA _____ $10\times$

- B. 50 μ L de DNA = 100 μ L de sangue total (assumindo 100% de eficiência no processo de extração de DNA)

- C. 100 μ L de sangue total _____ 10 \times
1000 μ L de sangue total _____ 100 \times

4.2.7 Análises estatísticas

Os casos foram divididos entre óbitos e sobreviventes; e entre pacientes com LPHS e não-LPHS para análise. Cada grupo foi subdividido entre casos confirmados, suspeitos e não confirmados. Análises estatísticas descritivas (média e desvio-padrão ou porcentagem, qui-quadrado ou teste exato de Fisher para comparação de duas variáveis dicotômicas, teste de Mann-Whitney para a comparação entre dois subgrupos e teste de Kruskal-Wallis para comparação entre mais de dois subgrupos) foram realizadas para identificar covariáveis de risco, usando o software EpiInfo v 3.5.1 for Windows (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EUA). As covariáveis identificadas como significativas na análise descritiva ($P < 0,1$) foram incluídas na construção do modelo de regressão logística univariado usando o software R v. 2.14.0 para Windows (*The R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria). As covariáveis significativas no modelo univariado ($P < 0,1$) foram incluídas no modelo de regressão logística multivariado. O modelo multivariado final foi construído por processo BWE (*backward elimination*). Significância estatística foi assumida para valores de $P < 0,05$. O ponto de corte prognóstico foi determinado por análise ROC univariada da carga bacteriana nos grupos óbito *versus* sobrevivência, e LPHS *versus* não-LPHS.

4.3 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

Os experimentos descritos nesse capítulo foram conduzidos durante o estágio sanduíche realizado no *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Georgia, EUA. Todos os experimentos descritos abaixo foram repetidos três vezes, de maneira independente, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados.

4.3.1 Matrizes ambientais de água

Foram avaliadas três matrizes diferentes de água ambiental, coletadas em Março de 2010 na região metropolitana de Atlanta (GA, EUA). Para todas as amostras, um recipiente estéril foi usado para a coleta de oito litros de água, que foram armazenados a 4°C até o momento do uso.

Foram obtidas amostras de água de esgoto da planta de tratamento *Snapfinger Creek*, e amostras de água de um lago (coordenadas: 33°48'07"N 84°18'26"W), ambos localizados em Decatur (GA, EUA). Outra amostra de água foi coletada do rio Chatahoochee na Área Nacional de Recreação (coordenadas: 33°59'17"N 84°17'38"W), em Roswell.

Além das matrizes de água ambiental descritas acima, água ultrapura foi usada em todos os experimentos como uma matriz de água livre de inibidores. Portanto, foram utilizadas quatro matrizes de água para cada experimento.

4.3.2 Experimentos de contaminação *in vitro*

A contagem de leptospiros e o procedimento de contaminação descritos no item 4.1.5 foram usados para contaminar artificialmente alíquotas de cada matriz de água para uso nos experimentos subsequentes.

Para experimentos em que foi necessária a contaminação *in vitro* de alíquotas das amostras com *Escherichia coli*, a mesma foi cultivada em ágar sangue de carneiro por 24h. A seguir, colônias isoladas foram ressuspendidas em 3 mL de PBS 1×. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada com PBS 1× à do tubo 0,5 da escala de McFarland.

4.3.3 Seleção do kit para extração de DNA

Seis alíquotas de 50 mL de cada uma das matrizes de água (item 4.3.1) foram contaminadas com 1×10^5 leptospiros/mL. Das seis alíquotas, quatro foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 15 min a TA. O sobrenadante foi descartado e os quatro *sedimentos* foram usados para avaliar em duplicata os seguintes kits comerciais para extração de DNA: QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) e PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA). Os procedimentos foram realizados conforme instruções dos fabricantes.

As duas alíquotas não centrifugadas foram usadas para avaliar o kit PowerWater DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA). Após montagem do aparato de filtração conforme recomendado pelo fabricante, as amostras foram filtradas através de papel de filtro de 11 μ m. A seguir, as amostras de água foram filtradas novamente através de uma membrana de 0,22 μ m. As membranas foram manipuladas assepticamente para permitir a extração do DNA conforme preconizado pelo fabricante.

4.3.4 Otimização dos parâmetros de concentração das amostras

Foram avaliados dois protocolos diferentes para concentração das amostras ambientais de água. Cinco alíquotas de 40 mL de cada matriz foram contaminadas com 1×10^5 leptospiros/mL. Duas alíquotas foram submetidas à centrifugação a $3.000 \times g$ por 20 min a TA (protocolo 1), enquanto as outras duas alíquotas foram concentradas a $15.000 \times g$ por 20 min a 4°C (protocolo 2). Após a remoção cuidadosa dos sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspensos no líquido remanescente e submetidos à extração de DNA usando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA). Para controlar o processo de concentração quanto à perda devido à remoção do sobrenadante, 200 μ L da quinta alíquota contaminada referente a cada matriz foram submetidos à extração de DNA usando o método acima, sem nenhum processo prévio de concentração.

4.3.5 Otimização do processo de sedimentação das amostras

Para otimizar a recuperação do material em suspensão nas amostras ambientais de água, oito alíquotas de 40 mL de água ultrapura foram contaminadas com 1×10^5 leptospiros/mL. As alíquotas foram organizadas em duplicatas e contaminadas com 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 *E. coli*/mL. Uma duplicata contaminada com *Leptospira* não foi acrescida de *E. coli*, e outra duplicata foi contaminada apenas com 1×10^7 *E. coli*/mL. Após a contaminação, as alíquotas foram centrifugadas seguindo o protocolo 2 (item 4.3.4). Os sedimentos resultantes foram submetidos à extração de DNA usando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA).

4.3.6 Determinação do volume ótimo de amostra

Três alíquotas de 40, 80, 200 e 400 mL de cada uma das quatro matrizes de água foram contaminadas com 1×10^5 leptospiros/mL e 1×10^7 *E. coli*/mL. Amostras de esgoto não foram acrescidas de *E. coli* porque essa bactéria, assim como outros coliformes fecais, sabidamente está presente em grandes quantidades nessa matriz.

As alíquotas foram divididas em frações de 40 mL para centrifugação, seguindo o protocolo 2 (item 4.3.4). Os sedimentos resultantes foram agrupados e centrifugados novamente usando os mesmos parâmetros, até atingir a formação de um sedimento único para cada alíquota inicial de amostra. O sedimento final foi ressuspenso e submetido à extração de DNA utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA).

4.3.7 Determinação do limite mínimo de detecção para cada matriz ambiental

Cinquenta mL de cada uma das matrizes biológicas foi contaminada artificialmente com 1×10^6 leptospiros/mL e diluída seriadamente 1:10 até a concentração de 1 leptospira/mL, num volume final de 50 mL. Alíquotas de 40 mL de cada diluição foram

contaminadas com 1×10^7 *E. coli*/mL (exceto pelas diluições de água de esgoto, que não foram contaminadas com *E. coli*). Para controlar o efeito da adição de *E. coli*, foi preparada uma série de diluições seriadas usando água ultrapura contaminada apenas com *Leptospira*.

As alíquotas de 40 mL foram centrifugadas usando o protocolo 2 (item 4.3.4.) e os sedimentos resultantes foram submetidos à extração de DNA utilizando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA).

4.3.8 Quantificação do DNA bacteriano por qPCR

A quantificação da carga bacteriana foi realizada conforme descrito no item 4.2.6. Para as amostras ambientais, apenas foi realizada a amplificação do gene *lipL32*. A quantificação final obtida pela qPCR para alíquotas de 40 mL foi convertida de GEq/5 μ L para GEq/mL usando o fator de correção 0,5 \times , deduzido conforme detalhado abaixo:

A. $5 \mu\text{L} \text{ } \underline{\hspace{1cm}} 1\times$
 $100 \mu\text{L} \text{ } \underline{\hspace{1cm}} 20\times$

B. $100 \mu\text{L de DNA} = 40 \text{ mL de amostra } \underline{\hspace{1cm}} 20\times$ (assumindo 100% de eficiência na extração do DNA).

C. $40 \text{ mL de amostra } \underline{\hspace{1cm}} 20\times$
 $1 \text{ mL de amostra } \underline{\hspace{1cm}} 0,5\times$

Seguindo o mesmo raciocínio, os fatores de correção utilizados para os demais volumes testados foram os seguintes:

A. $80 \text{ mL de amostra} = 0,25\times$
B. $200 \text{ mL de amostra} = 0,1\times$
C. $400 \text{ mL de amostra} = 0,05\times$

4.3.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no item 4.1.12.

4.4 MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

4.4.1 Construção do controle interno

Para a construção do controle interno, foi usada a estratégia de *overlapping extension* PCR associada ao uso de um vetor viral (bacteriófago M13) para permitir a construção de um controle tipo *armored* DNA, mais resistente à ação de nucleases do que plasmídeos. Essa estratégia já foi descrita para uso com vírus DNA (MENG *et al.*, 2009; GOTSCH *et al.*, 2007; STOCHER & BERG, 2004).

4.4.1.1. Produção do inserto

O inserto foi produzido usando a técnica de *overlapping extension* PCR (HECKMAN & PEASE, 2007; STOCHER *et al.*, 2003) para permitir a mutagênese sítio-dirigida no local de anelamento da sonda usada, em conjunto com um par de iniciadores, para detectar a amplificação parcial tanto do gene *lipL32* quanto do controle interno. O esquema utilizado para a *overlapping extension* PCR está representado na Figura 7.

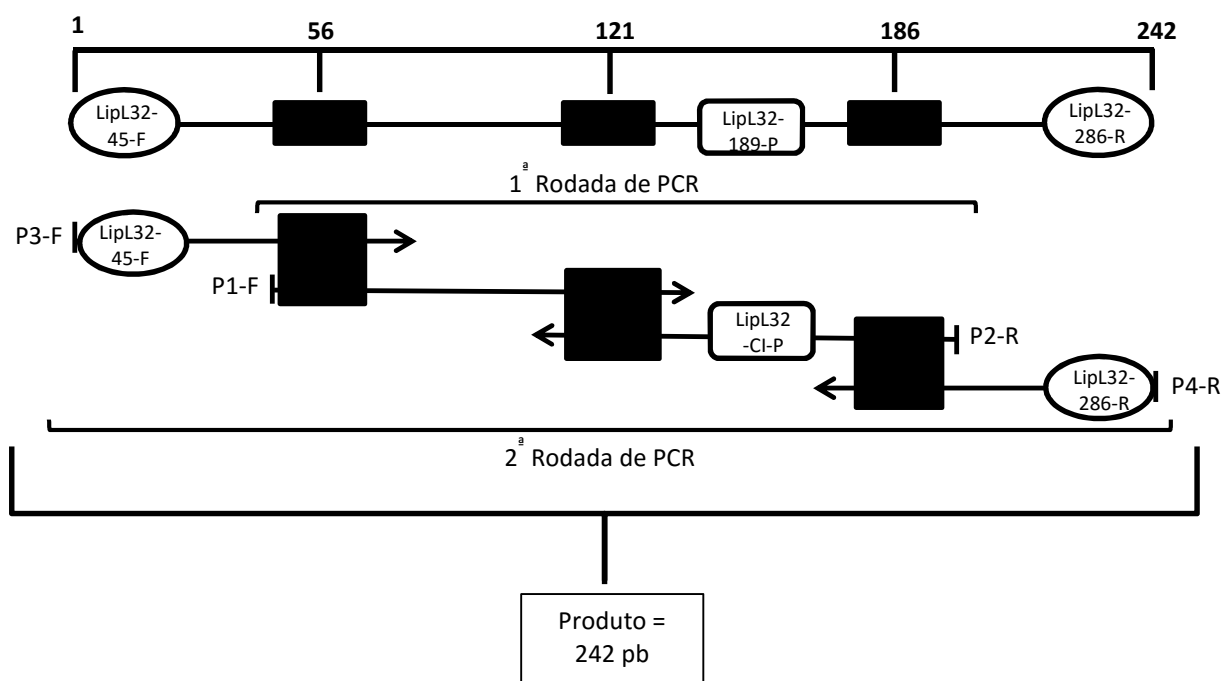


Figura 7 – Representação esquemática da construção do inserto de DNA usado na síntese do controle interno.

Os blocos pretos mostram as regiões de complementaridade entre os iniciadores (P1-F e P2-R, para a 1ª rodada de PCR; P3-F e P4-R para a 2ª rodada de PCR). Os balões mostram as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos usados para a amplificação parcial do gene *lipL32* por qPCR.

O produto de PCR, usado como inserto, foi gerado em duas rodadas independentes e sequenciais de PCR, usando os iniciadores descritos na Tabela 4. A mistura de reação para cada reação consistiu de 2,5 µL de 10× *Pfx* Amplification Buffer (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA), 300 nM de dNTP, 1 mM de MgSO₄, 400 nM dos iniciadores senso a antissenso e 0,2 U de Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). O volume final da mistura de reação foi ajustado com água ultrapura para 25 µL para a 1ª PCR e 24 µL para a 2ª PCR. Para a amplificação, foi utilizado o GeneAMP PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A ciclagem para as duas PCRs consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s e extensão a 68°C por 45 s; e extensão final a 68°C por 7 min. Após o término da 1ª PCR, 1 µL do produto foi usado como molde na 2ª PCR. A 2ª PCR gerou um produto de 242 pb, cuja presença foi confirmada por eletroforese. O produto da 2ª PCR foi purificado usando kit comercial (Purelink PCR Purification kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e quantificado por espectrofotometria (ND-1000 Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

Tabela 4 – Sequências dos oligonucleotídeos usados para gerar o fragmento de DNA utilizado na construção do controle interno.

	Iniciador	Sequência (5'- 3')
1ª PCR	P1-F	ACT CTT TTG TTC TGA GCG AGG ACA CAA TCC CAG GGA CAA ACG AAA CCG TAA AAA CGT TAC TTC CCT ACG GAT CTG TGA TCA AC
	P2-R	TAT GCT TTT TTG TTT CCA TCG ACT AAA CCG TCA <u>GAG AGT GCG</u> <u>CGT GAC CGA</u> ACG TAT CCG TAA TAG TTG ATC ACA GAT CCG TAG
2ª PCR	P3-F	<u>AAG CAT TAC CGC TTG TGG TGC</u> TTT CGG TGG TCT GCC AAG CCT AAA AAG CTC TTT TGT TCT GAG CG
	P4-R	<u>GAA CTC CCA TTT CAG CGA TTA</u> CGG CAG GAA TCC AAA CAT AGA GAT AGT ATG CTT TTT TGT TTC CAT

Os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos usados para detectar o gene *lipL32* estão sublinhados. As regiões de complementaridade entre os iniciadores estão ressaltadas em negrito.

4.4.1.2. Preparo do vetor

O vetor M13mp18 (7.249 pb, GenBank X02513.1), derivado do bacteriófago M13 DNA simples-fita, foi usado nos experimentos. O sítio múltiplo de clonagem do vetor e a posição usada para a clivagem estão ilustrados na Figura 8. O vetor foi digerido durante a noite por 18 h a 25°C com a enzima de restrição *Sma* I, seguindo as orientações e o protocolo sugeridos pelo fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). O produto da digestão foi purificado usando a técnica de fenol-clorofórmio seguindo o protocolo sugerido por Sambrook e Russell (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). O *sedimento* seco resultante da purificação foi desfosforilado para evitar a recircularização na ausência do inserto. Foram usadas 2 U de SAP (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD, EUA), 2 µL de Tampão 10×, com ajuste do volume final para 20 µL com água ultrapura. A mistura foi incubada a 37°C por 2 h, com posterior inativação da enzima a 65°C por 15 min. A eficiência da desfosforilação foi verificada por eletroforese de alíquotas do vetor digerido

e não digerido. O vetor digerido foi quantificado usando o espectrofotômetro (ND-1000 Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

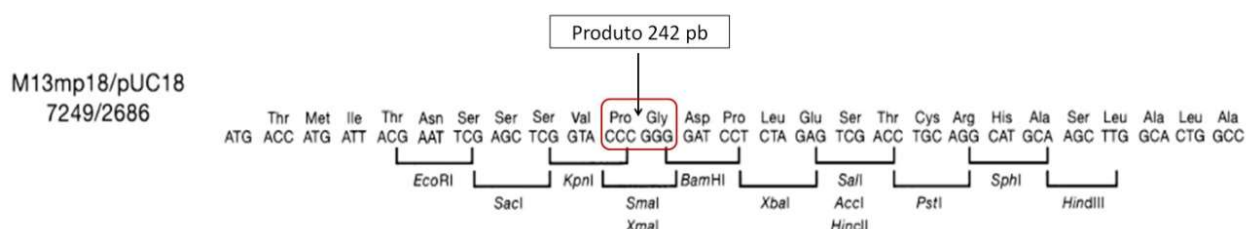


Figura 8 – Sítio múltiplo de clonagem do vetor M13mp18.

A caixa vermelha mostra o sítio de restrição da enzima *Sma* I, local de clonagem do inserto de 242 pb gerado por *overlapping extension* PCR.

Fonte: A Autora, baseada em (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

4.4.1.3. Ligação do inserto

Para a ligação, seguiu-se uma proporção molar de 1 parte de vetor para cada três partes de inserto, partindo-se de 100 ng de vetor.

A mistura de ligação consistiu de 3 µL de vetor digerido, 1 µL de T4 DNA Ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1 µL de tampão 5×, 1 µL de produto de PCR purificado e água ultrapura para 10 µL. A reação foi incubada durante a noite por 18 h a 16°C.

4.4.1.4. Transformação em *E. coli*

Para a transformação, foi utilizada *E. coli* cepa TOP10F' {genótipo F'[*lacI*q, *Tn10*(*TetR*)] *mcrA* Δ(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*} quimicamente competente. O preparo da cepa quimicamente competente e o processo de transformação foram realizados conforme protocolo descrito anteriormente (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Alíquotas da cepa quimicamente competente foram armazenadas a -80°C até o momento do uso. Em resumo, imediatamente após o descongelamento adicionou-se 5 µL da reação de ligação a 100 µL de cepa quimicamente competente. Após homogeneização suave, a

mistura foi incubada em banho de gelo por 30 min. A mistura foi transferida para um banho-maria a 42°C e incubada por 1 min, retornando imediatamente ao banho de gelo. Simultaneamente, 200 µL de *E. coli* TOP10F' (não competente) cultivada durante a noite por 18 h a 37°C com agitação foi adicionada a 3 mL de LB *soft agar* pré-aquecido a 47°C. A bactéria quimicamente competente transformada foi adicionada ao meio, que foi homogeneizado e rapidamente despejado sobre uma placa de meio LB suplementado com IPTG, X-GAL e ampicilina (100 µg/mL) e pré-aquecido a 37°C. A placa foi movimentada de forma circular para garantir uma distribuição homogênea do *soft agar* sobre o meio LB. Após a solidificação do *soft agar*, a placa foi incubada durante a noite por 18 h a 37°C.

4.4.1.5. Seleção de placas de lise fágicas e subcultivo

As placas de lise fágicas foram selecionadas a partir da placa de meio LB + *soft agar* descrita no item anterior. Para a seleção, uma pipeta Pasteur estéril foi usada para perfurar o meio na posição de cada placa de lise fágica. O fragmento de meio capturado foi dispensado em um tubo contendo 1 mL de meio LB. O tubo foi agitado e incubado a TA por 2 h para permitir a difusão das partículas virais para o meio líquido. A seguir, 100 µL da suspensão viral foram usados para infectar 5 alíquotas de 1 mL de meio LB líquido contendo *E. coli* TOP10F', cultivadas durante a noite por 18 h a 37°C. Cada subcultivo foi incubado a 37°C por 5 h. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000×g por 5 min.

4.4.1.6. Extração do DNA dupla-fita da forma replicativa

Um dos cinco sedimentos obtidos no item anterior foi submetido à minipreparação para extração do DNA dupla-fita da forma replicativa do bacteriófago M13, usando kit comercial (Perfectprep Miniprep kit, Eppendorf, Hamburg, Alemanha), conforme orientações do fabricante. O DNA resultante foi estocado a -80°C para ser usado para produção de novo lote de controle interno, quando necessário.

4.4.1.7. Preparo do precipitado viral

As partículas virais foram precipitadas a partir dos sobrenadantes obtidos no item 4.4.1.5. A cada um dos sobrenadantes foram adicionados 200 μ L de PEG 8.000 a 20% em 2,5 M de NaCl. Os tubos foram homogeneizados e incubados a TA por 15 min. Os precipitados foram recuperados por centrifugação a 13.000 \times g por 5 min a 4°C, com remoção posterior dos sobrenadantes.

4.4.1.8. Extração do DNA simples-fita da forma infectante

Após ressuspensão de um sedimentos gerados no item anterior em 100 μ L de tampão TE (pH 8,0), foram adicionados 100 μ L de fenol. Após homogeneização, o material foi incubado por 1 min a TA e centrifugado a 13.000 \times g por 5 min. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 290 μ L de etanol absoluto e 10 μ L de acetato de sódio 3M (pH 5,2). Após incubação por 15 min a TA, o DNA foi precipitado por centrifugação a 13.000 \times g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com 200 μ L de etanol 70% a 4°C. Após centrifugação a 13.000 \times g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e os resíduos de etanol foram removidos por incubação do tubo aberto a 42°C por 15 min. O DNA foi ressuspendido em 50 μ L de tampão TE (pH 8,0).

4.4.1.9. Confirmação da presença e orientação do inserto

O DNA obtido no item anterior foi amplificado por PCR utilizando a seguinte mistura de reação: 5 μ L de tampão 10 \times (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA), 400 nM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM dos iniciadores M13pUC-F (5'AGC GGA TAA GAA TTT CAC 3') e M13pUC-R (5'CGC CAG GGT TTT CCC AGT 3') e 0,5 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). O volume final da mistura de reação foi ajustado com água ultrapura para 50 μ L. A amplificação foi realizada no GeneAMP PCR System 9700

(Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s; e extensão final a 72°C por 7 min. O sítio de anelamento dos iniciadores está representado na Figura 9. Após confirmação da amplificação por eletroforese, o produto de PCR de 391 pb foi purificado usando o Purelink PCR Purification kit (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). Para a quantificação foi utilizado o Low DNA Mass Ladder 470 ng (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% em paralelo com o produto de PCR purificado. Após captura e digitalização da imagem, foi feita a quantificação utilizando o programa de análise KODAK DC120 (*Kodak Digital Science – Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120 Rochester, NY EUA*), conforme descrito no manual de instruções do programa. Em seguida as amostras foram diluídas com água ultrapura para 4 ng/μL.

6121	CACTCATTAG	GCACCCAGG	CTTTACACTT	TATGCTTCCG	GCTCGTATGT	TGTGTGGAAT
6181	TGTGAGCGGA	TAACAATTTT	ACACAGGAAA	CAGCTATGAC	CATGATTACG	AATTCGAGCT
6241	CGGTACCCGG	GGATCTCTTA	GAGTCGACCT	GCAGGCATGC	AAGCTTGGCA	CTGGCCGTCTG
6301	TTTTACAACG	TCGTACTGG	GAAAACCCTG	GCGTTACCCA	ACTTAATCGC	CTTGCAGCAC
6361	ATCCCCCTTT	CGCCAGCTGG	CGTAATAGCG	AAGAGGCCCG	CACCGATCGC	CCTTCCCAAC

Figura 9 – Localização dos sítios de anelamento dos iniciadores M13pUC-F e M13pUC-R (setas azuis) na sequência nucleotídica do vetor M13mp18 (GenBank X02513.1). O sítio de digestão com *Sma* I para posterior ligação do inserto está destacado em vermelho.

Foi realizada reação de sequenciamento bidirecional utilizando kit comercial (Big Dye Terminator v.3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A mistura de reação consistiu de 4 μL de Big Dye, 2 μL de tampão 5X, 320 nM de iniciador (LipL32-45F ou LipL32-286R) e 5 μL (20 ng) do produto de PCR purificado diluído. O volume final foi ajustado para 20 μL com água ultrapura. As reações foram processadas no GeneAMP PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando 1 ciclo a 96°C por 1 min, 35 ciclos a 96°C por 10s, 50°C por 5s e 60°C por 4 min.

Após o término da ciclagem, os produtos sequenciados foram purificados usando o Big Dye XTerminator Purification kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras foram submetidas à detecção no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EUA), utilizando capilar de 50 cm, polímero de acrilamida POP7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e programação padrão de corrida para esses parâmetros.

4.4.1.10. Preparo do *armored DNA*

Quatro dos cinco precipitados virais obtidos no item 4.4.1.7 foram ressuspensos em 150 μ L de tampão SM (Tris-HCl 50 mM; NaCl 100 mM; MgSO₄ 8mM) e unificados. Foi preparada uma diluição seriada 1:10 da suspensão viral (10^{-1} a 10^{-5}), das quais 20 μ L foram usadas para contaminar uma série de seis *sedimentos* preparados por centrifugação a 13.000 \times g por 20 min a 4°C (protocolo 2 do item 4.3.4) a partir de água de esgoto obtida em Curitiba, previamente negativa para presença de *Leptospira* por qPCR e artificialmente contaminada com 10^5 *Leptospira*/mL (seguindo o protocolo descrito no item 4.3.2). O DNA dos *sedimentos* contaminados com o *armored DNA* foi extraído usando o kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA) e testado por qPCR conforme descrito no item 4.3.8, com adição de 100 nM da sonda QS-lepto-LipL32 (5' VIC TCG GTC ACG CGC ACT CTC T BHQ1 3') à mistura de reação.

Após a detecção por PCR em tempo real, foi preparada uma alíquota de 15 mL da diluição adicional 10^{-7} , que foi distribuída em alíquotas de 500 μ L, estocadas a -80°C até o momento do uso.

4.4.2 Local do estudo

A validação da aplicabilidade da qPCR para quantificação de leptospiros em amostras ambientais de água foi conduzida na comunidade de Pau da Lima (coordenadas: 12°55'13"S 38°26'29"W), localizada em Salvador (BA). A área de estudo tem 0,46 km² e apresenta alta incidência de leptospirose (57,8 casos /100.000 habitantes) (REIS *et al.*, 2008). O último censo realizado na comunidade, conduzido pela equipe da FIOCRUZ-BA em 2008, identificou 12.651 habitantes. Desses, 88% são posseiros que não completaram o ensino fundamental (66%) e cuja renda média *per capita* é de R\$5,00/dia (dados não publicados).

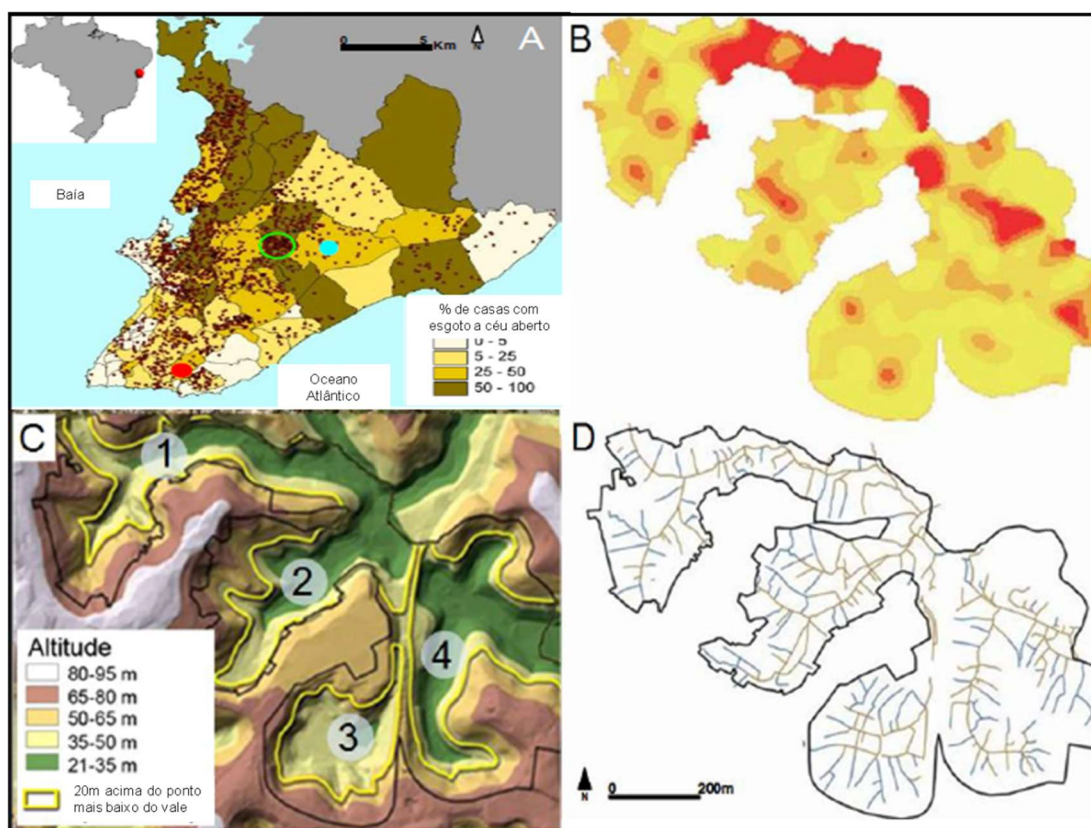


Figura 10 – Caracterização geográfica, topográfica e epidemiologia da leptospirose na comunidade de Pau da Lima (Salvador, BA).

A figura 10A mostra a localização de Salvador no Brasil, e o local do estudo (círculo verde) dentro da comunidade. Os pontos marrons indicam a localização geográfica dos casos de leptospirose identificados em Salvador entre 1996 e 2009. A figura 10B mostra o gráfico de densidade de Kernell para os casos de leptospirose identificados entre 2003 e 2007 por estudo de coorte prospectiva conduzida em Pau da Lima. A figura 10C mostra o mapa topográfico de Pau da Lima com a identificação dos quatro vales, numerados de 1 a 4. A figura 10D mostra a localização dos esgotos a céu aberto (linhas marrons) e sistemas de drenagem de água pluvial (linhas azuis) no local de estudo.

Fonte: Figuras e dados gentilmente cedidos pelo Dr. Federico Costa (FIOCRUZ-BA).

4.4.3 Desenho experimental

Foi utilizado um desenho experimental fatorial não balanceado. Esse tipo de desenho foi utilizado para verificar associação de fatores macroambientais ao maior risco de infecção nos fundos de vale. Todas as coletas foram conduzidas em apenas um vale, visto que não foi objetivo do estudo avaliar fatores de variação entre os vales.

Três fatores categóricos foram considerados no desenho experimental:

- A. Macroambiente: o vale 2 foi avaliado nos níveis topográficos baixo (0-19m); médio (20-40m) e alto (>40m);
- B. Tipo de água: foram avaliadas amostras de água de esgoto e água empoçada;
- C. Período de coleta: as amostras foram coletadas no período úmido (julho) e de média umidade (outubro) do ano. Os períodos foram estabelecidos com base na média da série histórica (1996-2009) do índice pluviométrico em Salvador.

Em cada período de coleta, as amostras foram coletadas duas vezes por dia: (pela manhã - 8 às 10h - e à tarde - 16 às 18h), três vezes por semana (as segundas, quartas e sextas-feiras). A coleta foi realizada por duas semanas consecutivas durante o período úmido (julho) e por uma semana no período de umidade intermediária (outubro).

O grau de replicação das coletas foi balanceado para as matrizes de água (uma amostra de água de esgoto e uma de água empoçada coletadas de cada ponto), mas não balanceado para o macroambiente devido à comprovação anterior de que a altitude da residência no local do estudo é um fator de risco para a leptospirose (REIS *et al.*, 2008). Assim, foram selecionados oito pontos de coleta no nível topográfico baixo, quatro pontos no nível médio e dois pontos no nível alto.

Desse modo, o número esperado de amostras no estudo foi:

$$(8+4+2) \times [(2 \times 6) + (2 \times 12)] = 504$$

4.4.4 Coleta de amostras

No momento da primeira coleta de amostras, os pontos de coleta foram georreferenciados para permitir o retorno ao mesmo ponto no segundo período de coleta. Para os níveis topográficos baixo e médio, os pontos de coleta foram organizados em intervalos definidos conforme ilustrado na Figura 11. Para o nível alto, os dois pontos de coleta foram estabelecidos no cume de cada elevação formadora do vale. Para cada ponto de coleta de água de esgoto foi estabelecido um ponto equivalente para coleta de amostra de água empoçada. No caso de não haver água empoçada disponível no ponto

exato de coleta, a amostra foi coletada dentro de um raio de 2 m a contar do ponto estabelecido. Se nessa área não houve formação de poças de água, a amostra não foi coletada.

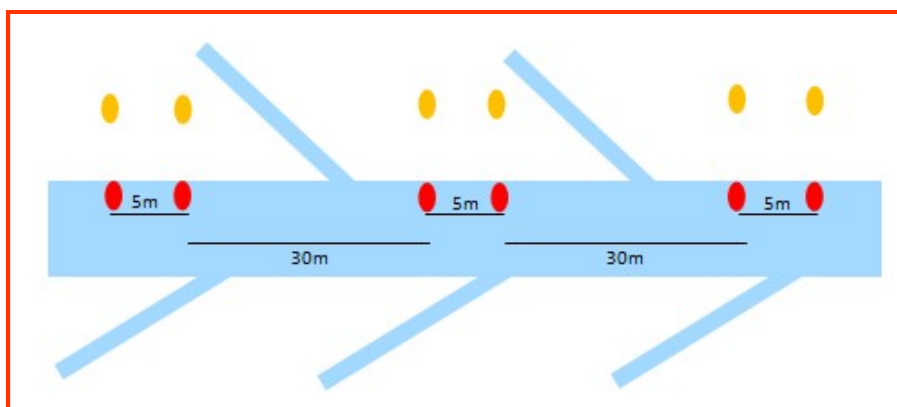


Figura 11 – Esquema para coleta de amostras ambientais.

As áreas em azul representam sistema de drenagem de esgoto a céu aberto. Os pontos vermelhos representam pontos para coleta de água de esgoto, enquanto os pontos amarelos representam pontos para coleta de amostras de água empoeçada. Nessa representação, a direção do fluxo de água seria para a direita, enquanto o fluxo de coleta seria o oposto.

O procedimento para a coleta consistiu em submergir tubos de plástico graduados e estéreis, tipo Falcon, nos pontos estabelecidos para obter 50 mL de amostra. Os tubos contendo as amostras foram acondicionados em caixas térmicas e transportados para o laboratório, onde foram processadas em no máximo 18h.

4.4.5 Concentração das amostras

No laboratório, foi retirada uma alíquota de 40 mL de cada uma das amostras. Essas alíquotas foram centrifugadas a $15.000 \times g$ por 20 min a 4°C (protocolo 2), descrito no item 4.3.4. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e os sedimentos remanescentes foram imediatamente congelados a -80°C e remetidos em gelo seco para Curitiba.

4.4.6 Extração de DNA

A extração do DNA dos sedimentos foi realizada em Curitiba. Após o descongelamento dos sedimentos e contaminação com 20 µL da diluição 10^{-7} do CI (preparada conforme item 4.4.1.10), o DNA foi extraído usando o PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

4.4.7 Quantificação do DNA bacteriano por qPCR

Para a detecção do gene *lipL32* e do CI, mistura de reação consistiu de 12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 200 nM dos iniciadores senso (*LipL32-45F*) e anti-senso (*LipL32-286R*), 100 nM de cada sonda (*LipL32-189* e *QS-lepto-LipL32*), 5 µL de DNA extraído (ou água ultrapura, no caso de controle negativos de DNA). O volume final da reação foi ajustado para 25 µL com água ultrapura. As reações de PCR em tempo real foram realizadas usando o equipamento ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O protocolo de amplificação consistiu de 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento e extensão a 60°C por 1 min.

O resultado de Ct para a detecção do CI em cada amostra foram utilizados para validar os resultados da quantificação do gene *lipL32*. Foram considerados válidos Cts entre 34 e 38. A partir dos dados obtidos por amplificação dos oito calibradores (incluídos em cada corrida), o software efetuou análise de regressão linear do logaritmo da concentração contra a média de Ct para cada calibrador. Os resultados de Ct para *lipL32* foram interpolados na linha de regressão para a quantificação. Foi considerada a média de quantificação do gene *lipL32* em cada amostra. A quantificação final foi obtida usando o fator de correção $\times 0,5$, descrito no item 4.3.8.

4.4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no item 4.2.7.

5 RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi dividida em quatro seções. A primeira apresenta os dados da validação analítica e de desempenho diagnóstico do método baseado em PCR em tempo real em amostras clínicas humanas, necessários para implementação do teste como ferramenta diagnóstica. A segunda seção apresenta os resultados referentes à avaliação do valor de carga bacteriana como variável independentemente relacionada ao desenvolvimento de desfechos graves. A terceira seção aborda a adaptação e otimização do método baseado em PCR em tempo real para a detecção de leptospirosas patogênicas em amostras ambientais de água. A quarta seção apresenta os resultados da validação do método otimizado em amostras ambientais coletadas em área hiperendêmica.

5.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA

5.1.1 Caracterização dos pacientes

Para caracterização dos 150 pacientes com suspeita clínica de leptospirose incluídos nessa etapa do estudo, foram obtidos dados demográficos e clínico-laboratoriais (Tabela 5). Uma vez que não houve diferença significativa na avaliação dos dados obtidos para os dois locais onde o estudo foi conduzido, os dados foram agrupados para análise. A população incluída no estudo foi majoritariamente do sexo masculino (88,2%), em idade produtiva ($34,5 \pm 15,0$ anos). A maioria dos pacientes apresentou febre (93,7%) e icterícia (78,0%) e procurou atendimento médico após apresentar sintomas por vários dias ($6,8 \pm 4,8$ dias).

Tabela 5 – Características dos casos confirmados de leptospirose recrutados em Salvador e Curitiba e incluídos na validação diagnóstica de método baseado em PCR em tempo-real.

Características	Salvador (n=85)		Curitiba (n=42)		Total (n=127)	
	n*	Média (DP) ou %	n*	Média (DP) ou %	n*	Média (DP) ou %
Idade (anos)	85	34,2 (14,5)	42	34,9 (16,1)	127	34,5 (15,0)
Sexo masculino	85	89,4	42	85,7	127	88,2
Dias com sintomas	84	6,3 (5,0)	42	7,7 (4,4)	126	6,8 (4,8)
Febre	85	95,3	42	90,5	127	93,7
Sufusão conjuntival	85	14,1	42	16,7	127	15,0
Contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$)	82	14,5 (7,4)	42	12,0 (5,9)	124	13,7 (7,0)
Icterícia	85	78,8	42	73,8	127	78,0
Bilirrubina sérica total (mg/dL)	47	11,4 (9,5)	38	11,5 (11,7)	85	11,5 (10,5)
Oligúria	85	25,9	42	26,2	127	26,0
Creatinina sérica (mg/dL)	84	5,6 (12,1)	40	5,3 (7,8)	124	5,5 (10,9)
Uréia (mg/dL)	85	43,8 (41,9)	40	43,9 (35,2)	125	43,8 (39,8)

*Número de respostas disponíveis

5.1.2 Determinação do intervalo de linearidade e eficiência

A amplificação dos calibradores (diferentes concentrações da curva-padrão) foi linear nas oito ordens de magnitude testadas. A regressão linear dos dados resultou numa reta com coeficiente de regressão (R^2) de 0,9944. Com base no coeficiente angular da reta (-3,4380), a eficiência do sistema de amplificação foi estimada em 96,0%. A avaliação do coeficiente linear confirmou o ponto de corte para interpretação em 40 ciclos.

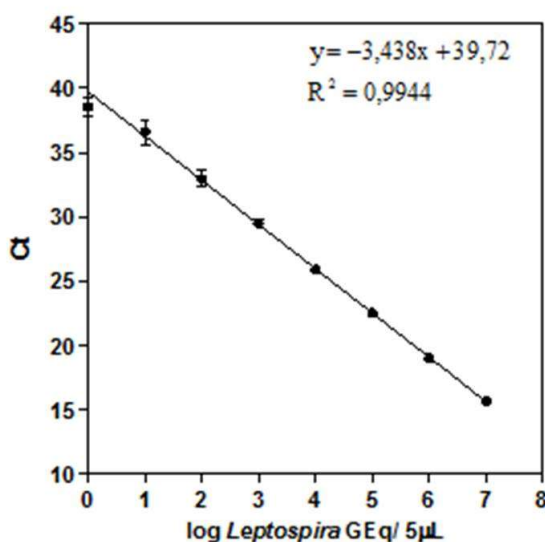


Figura 12- Avaliação da linearidade do método baseado em PCR em tempo real. As barras de erro representam a média \pm DP.

5.1.3 Determinação da acurácia e do efeito de matriz biológica

Como não há disponibilidade comercial de padrões quantitativos para *Leptospira*, a acurácia foi avaliada usando ensaios de contaminação artificial (*spiking*). A regressão linear utilizando todos os dados obtidos nos ensaios de *spiking* mostrou que o método é altamente acurado (coeficiente angular= 0,9396; coeficiente linear=0,5745). A comparação dos coeficientes angulares e lineares das retas obtidas por regressão linear dos dados obtidos nos ensaios de *spiking* para cada matriz biológica em relação à água ultrapura mostrou que o efeito de matriz não foi significativo para amostras de sangue

total ($P=0,2603$), mas foi significativo para soro ($P<0,0001$). Como ilustrado na Figura 13, não foi possível detectar concentrações de *Leptospira* menores do que 1×10^3 GEq/mL nos ensaios de contaminação artificial com amostras de soro.

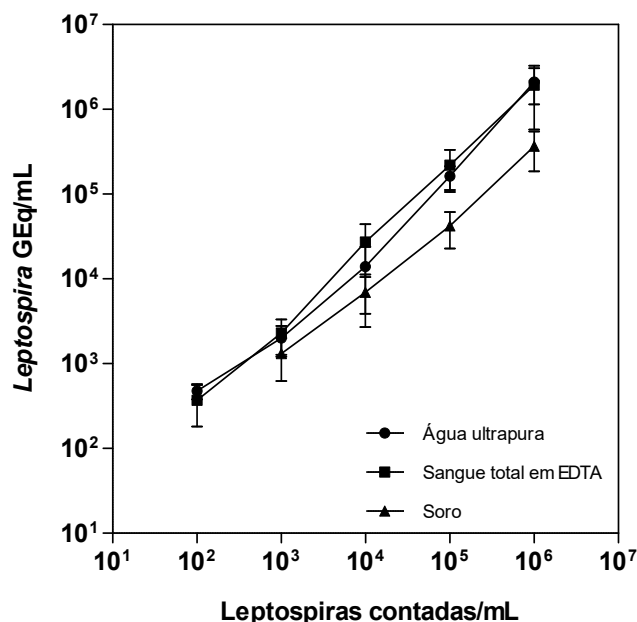


Figura 13 – Avaliação da acurácia e determinação do efeito de matriz biológica sobre o desempenho do teste baseado em PCR em tempo real. As barras de erro representam a média geométrica \pm DP geométrico.

5.1.4 Determinação da precisão

Dados obtidos por amplificações sucessivas dos oito calibradores mostraram que o desvio-padrão (DP) dos logaritmos das concentrações dos calibradores variou de 0,06 a 0,17 no ensaio de repetibilidade. Esses valores foram muito próximos aos obtidos para o ensaio de reprodutibilidade (0,05 a 0,16), como detalhado na Tabela 6. A avaliação da precisão do ensaio mostrou que o coeficiente de variação do Ct oscilou entre 0,9 (para a concentração 1×10^7 GEq/mL) e 83,8% (para a concentração 1×10^0 GEq/mL).

Tabela 6 – Análise de precisão do método baseado em PCR em tempo real.

Conc. nominal (GEq/5 µL)	Repetibilidade*				Reprodutibilidade†			
	Conc média (GEq/5 µL)	Média de Ct	DP (Log ₁₀)	CV (%)	Conc média (GEq/5 µL)	Média de Ct	DP (Log ₁₀)	CV (%)
10.000.000	11.187.790	15,65	0,06	0,86	10.497.559	15,71	0,06	0,88
1.000.000	1.134.389	19,00	0,07	1,10	1.095.684	19,03	0,05	0,90
100.000	103.669	22,50	0,07	1,34	96.961	22,57	0,08	1,53
10.000	10.191	25,91	0,06	1,53	10.261	25,89	0,05	1,28
1.000	935	29,48	0,07	2,20	1.014	29,38	0,09	3,12
100	98	33,06	0,07	3,51	111	32,86	0,09	4,28
10	12	36,62	0,11	10,61	12	36,61	0,13	12,51
1	2	38,44	0,17	68,44	2	38,64	0,16	83,80

* Calculado com base em 10 replicatas testadas no mesmo dia.

† Calculado com base em 2 replicatas testadas em 32 dias (n=64).

5.1.5 Determinação da sensibilidade analítica

Segundo a análise de regressão probit realizada a partir da análise de 24 replicatas de oito padrões com concentrações variando de 20 a 1 GEq/5 μ L (2.000 a 100 GEq/mL), o LMD com 95% de *hit-rate* seria alcançado na concentração 2,8 GEq/5 μ L (280 GEq/mL).

Tabela 7 – Dados utilizados para análise de regressão probit.

Concentração (GEq/5 μ L)	Replicatas testadas	Replicatas positivas	Positividade (%)
20	24	24	100,0
10	24	24	100,0
7	24	24	100,0
5	24	24	100,0
4	24	24	100,0
3	24	23	95,8
2	24	13	54,2
1	24	3	12,5

5.1.6 Desempenho diagnóstico da PCR em tempo real

A estratificação dos resultados qualitativos obtidos por PCR em tempo real em relação à confirmação laboratorial por MAT ou cultura microbiológica (critérios assumidos em conjunto para compor o *gold-standard*), para amostras de sangue total em EDTA e soro, está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação entre resultados de PCR em tempo real frente à confirmação laboratorial para amostras de sangue total em EDTA e soro de casos confirmados, não confirmados e grupos-controle.

		MAT + cultura microbiológica					
		Sangue total em EDTA			Soro		
		R*	NR*	T*	R	NR	T
PCR em tempo real	D*	77	12	89	37	3	40
	ND*	50	193	243	90	202	292
	T	127	205	332	127	205	332

*R=reagente; NR=não reagente; T=total; D=detectável; ND=detectável.

Com base nos dados da Tabela 8 foram calculados os parâmetros para avaliação de desempenho diagnóstico do teste, mostrados na Tabela 9. A sensibilidade e a especificidade clínicas foram maiores para amostras de sangue total em EDTA do que para amostras de soro. O valor preditivo positivo foi maior para amostras de soro (92,5 vs. 86,5%), enquanto o valor preditivo negativo foi maior em amostras de sangue total em EDTA (79,4 vs. 69,2%).

Tabela 9 – Sensibilidade e especificidade diagnósticas e valores preditivos para o método baseado em PCR em tempo na análise de amostras de sangue total em EDTA e soro.

	Sensibilidade%	Especificidade%	VPP%*	VPN%†
	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
Sangue total em EDTA	60,6 (51,5-69,1)	94,1 (89,7-96,8)	86,5 (77,2-92,5)	79,4 (73,7-84,2)
Soro	29,1 (21,6-38,0)	98,5 (95,4-99,6)	92,5 (78,5-98,0)	69,2 (63,5-74,3)

*Valor preditivo positivo;

†Valor preditivo negativo.

Os resultados de PCR em tempo real foram estratificados de acordo com a confirmação laboratorial e dias com sintomas; e de acordo com a disponibilidade de amostra convalescente para os pacientes não confirmados (Tabela 10). A estratificação mostrou que a sensibilidade clínica variou de acordo com os dias com sintomas, sendo maior durante os primeiros seis dias de doença. Os dados também mostraram que a sensibilidade clínica foi baixa (29,1%) na análise das amostras de soro.

Tabela 10 – Desempenho do método baseado em PCR em tempo-real para o diagnóstico de casos de leptospirose a partir de amostras de pacientes confirmados, não confirmados e grupos-controle.

Pacientes	No.	Sangue em EDTA	Soro
		Sensibilidade (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)
Casos confirmados	127	60,6 (51,5-69,1)	29,1 (21,6-38,0)
<7 dias com sintomas	65	86,1 (74,8-93,1)	43,1 (31,1-55,9)
≥7 dias com sintomas	62	33,9 (22,6-47,1)	14,5 (7,2-26,3)
Casos não confirmados	23	43,5 (23,9-65,1)	13,0 (3,4-34,7)
Amostra única	18	55,6 (31,3-77,6)	22,2 (7,4-48,1)
Amostras pareadas	5	0 (0-0,4)	0 (0-0,4)
Controles	182	1,1 (0,2-4,3)	0 (0-2,6)
Outra doença febril	122	1,6 (0,3-6,4)	0 (0-3,8)
Doadores de sangue	60	0 (0-7,5)	0 (0-7,5)

Os resultados mostraram que a sensibilidade da PCR em tempo real em amostras de sangue total em EDTA decaiu progressivamente ao longo do tempo e foi inversamente correlacionada com o aumento gradual no título recíproco do MAT (Figura 14).

Os pacientes que tiveram resultados detectáveis por PCR em tempo real (n=89) apresentaram menos dias de sintomas na admissão ($5,2 \pm 0,3$ vs. $8,7 \pm 0,7$; $P < 0,0001$) do que aqueles que tiveram resultados não detectáveis (n=63).

Todos os oito pacientes que tiveram resultados positivos na cultura foram detectados por PCR em tempo real. Foi observado que o Ct obtido para esses pacientes foi significativamente menor do que aquele obtido para os pacientes que tiveram apenas resultado detectável por PCR em tempo real ($33,2 \pm 0,6$ vs $36,7 \pm 0,3$; $P < 0,0001$). Os resultados confirmaram a baixa sensibilidade clínica da cultura (6,3%, IC 95% 3,0 – 12,4%) e demonstraram que a PCR em tempo real detectou a leptospiemia em 81 casos que foram negativos na cultura.

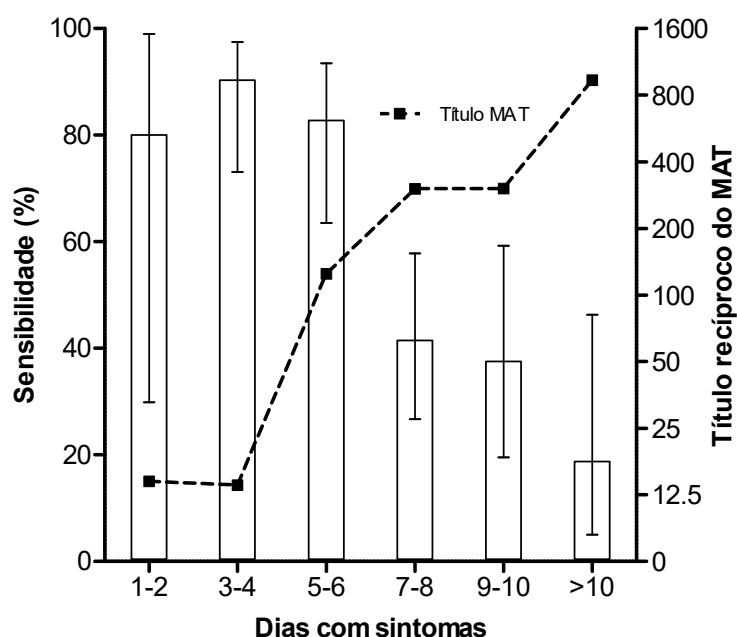


Figura 14 – Sensibilidade do teste baseado em PCR em tempo real em relação ao título recíproco do MAT para pacientes com suspeita clínica de leptospirose, estratificados por dias com sintomas.

Dos 150 casos suspeitos, 12 (8,0%) foram a óbito em virtude de complicações decorrentes da leptospirose. Todos os 12 casos com óbito foram detectados por PCR em tempo real. Desses, seis foram confirmados ou considerados casos prováveis pelo MAT e dois foram positivos também na cultura. O Ct observado para esses pacientes foi significativamente menor do que o observado para os sobreviventes ($33,6 \pm 0,8$ vs. $36,5 \pm 0,3$; $P < 0,0001$).

Para 18 dos 23 (78,3%) casos não confirmados, o diagnóstico laboratorial foi baseado somente na amostra aguda de soro. Dos 18 pacientes, 10 (55,5%) foram detectados por PCR em tempo real. Entretanto, nenhum dos cinco pacientes para os quais o diagnóstico de leptospirose foi excluído por análise da amostra convalescente foi detectado por PCR em tempo real.

Entre os 122 controles patológicos, dois (1,6%) foram detectados por PCR em tempo real mediante análise das amostras de sangue total em EDTA. Nenhum dos indivíduos sadios (doadores de sangue) teve resultado detectável por PCR em tempo real.

5.2 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE CARGA BACTERIANA E DESFECHO CLÍNICO EM CASOS DE LEPTOSPIROSE

5.2.1 Seleção dos pacientes

Durante o período do estudo foram recrutados 385 pacientes com suspeita clínica de leptospirose. Desses, 307 foram confirmados laboratorialmente usando os critérios previamente estabelecidos (item 4.2.3). Dos casos confirmados, foi coletada amostra de sangue total em EDTA de 296 pacientes, dos quais 280 tinham resultado de qPCR e foram incluídos no estudo (Figura 15). Desses, 17 foram a óbito em consequência da leptospirose. Dentre os 280 casos selecionados, 14 desenvolveram sinais de LPHS e desses, seis foram a óbito. Onze dos 17 pacientes que foram a óbito não apresentaram sinais de LPHS.

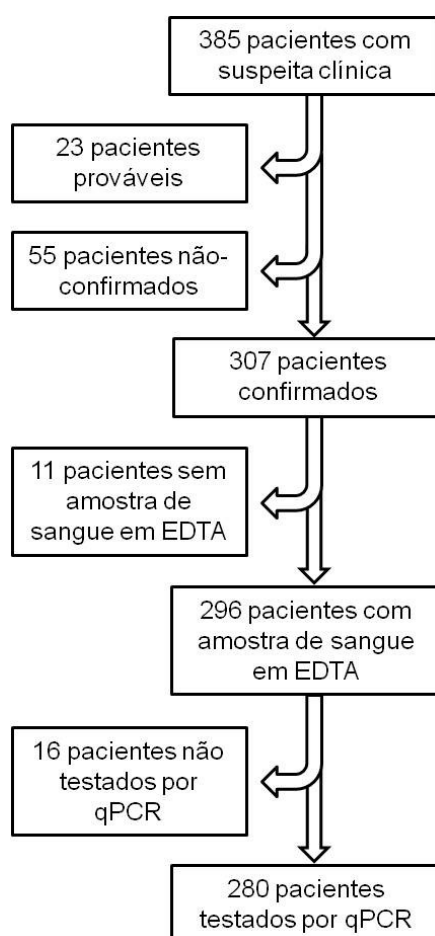


Figura 15 – Fluxograma para seleção de pacientes.

5.2.2 Caracterização dos pacientes

A Tabela 11 apresenta os dados demográficos e clínico-laboratoriais considerados nessa etapa do estudo. A idade média dos pacientes foi $35,4 \pm 14,5$ anos. Na população estudada, a proporção entre os sexos foi de aproximadamente sete homens para cada mulher.

A maioria dos pacientes apresentou febre (96,8%) e icterícia (84,6%) à admissão, que ocorreu quando os pacientes tinham em média seis dias com sintomas ($6,3 \pm 3,5$). Sufusão conjuntival, um sinal clínico considerado característico da leptospirose, foi observada em apenas 44 dos 280 casos (15,8%). Entretanto, foi significativamente mais frequente entre os pacientes que desenvolveram LPHS e óbito (35,7 e 37,5%, respectivamente). Oligúria ocorreu em 30% dos casos, sendo significativamente mais frequente entre os pacientes que foram a óbito (58,8%, $P < 0,05$). Aproximadamente a mesma proporção de pacientes apresentou hemoptise (25,7%), mas esse sinal foi observado em apenas um paciente que desenvolveu LPHS (mas sobreviveu à doença); e em um paciente que não desenvolveu LPHS (e foi a óbito). Uma pequena proporção dos pacientes apresentou alteração no estado mental (6,6%), mas esse achado foi significativamente mais frequente entre os pacientes que evoluíram para óbito (23,5%; $P < 0,05$). Arritmia cardíaca na admissão não foi identificada como possível covariável de risco (dados não apresentados).

Os valores de hematócrito sugeriram uma anemia discreta na população estudada ($33,5 \pm 6,0\%$). Foi observada anemia moderada (hematócrito $26,1 \pm 3,8\%$) em 71 pacientes. Desses, 16 (22,5%) eram mulheres e 55 eram homens (77,5%). Em média, os pacientes selecionados apresentaram leucocitose discreta ($14,7 \pm 6,9 \times 10^9/L$). Sessenta e um pacientes apresentaram contagem de leucócitos dentro dos limites da normalidade ($7,5 \pm 2,0 \times 10^9/L$), 106 apresentaram leucocitose discreta ($12,3 \pm 1,5 \times 10^9/L$) e 110 apresentaram leucocitose moderada ($21,0 \pm 6,7 \times 10^9/L$). Entretanto, quatro pacientes apresentaram leucopenia ($2,5 \pm 0,4 \times 10^9/L$), dos quais um foi a óbito. Dentre os pacientes incluídos no estudo, observou-se em média trombocitopenia discreta ($105,5 \pm 87,0 \times 10^9/L$). Foi observada trombocitopenia severa ($33,0 \pm 10,7 \times 10^9/L$) em 76 pacientes, enquanto 83 pacientes apresentaram trombocitopenia moderada ($73,6 \pm 13,8 \times 10^9/L$). No entanto, 41,6% dos pacientes ($n=114$) apresentaram trombocitopenia discreta ou contagem de plaquetas dentro dos limites da normalidade ($117,1 \pm 92,5 \times 10^9/L$).

Os marcadores de função hepática (AST, ALT e bilirrubina direta) apontaram evidências de dano hepatocelular, com aumento não expressivo das transaminases e elevação predominante de AST ($141,7 \pm 123,9$ UI/mL) em relação à ALT ($85,1 \pm 77,0$ UI/mL). Foi observada hiperbilirrubinemia marcante à custa da fração direta ($10,2 \pm 9,3$ mg/dL). Dentre os 195 pacientes para quais foi solicitada quantificação de bilirrubina e frações na admissão, 46 (23,5%) apresentaram valor de bilirrubina direta superior a 15 mg/dL ($22,3 \pm 10,0$ mg/dL).

Os marcadores de função renal (ureia e creatinina) indicaram aumento dos níveis séricos de creatinina e azotemia, caracterizando insuficiência renal aguda (IRA) na população estudada. Em média, a IRA foi oligúrica e normocalêmica. Dentre os 250 pacientes com dados de função renal na admissão, 17 (6,8%) apresentaram IRA não-oligúrica hipocalêmica.

Dentre os 280 pacientes selecionados, 116 (41,4%) tiveram resultado positivo de qPCR. Desses, 90 (78,9%) apresentavam sintomas há menos do que sete dias no momento da admissão. Para esses pacientes, a média geométrica da carga bacteriana foi 875 ± 10 GEq/mL. Sete (7,8%) dos 90 pacientes foram diagnosticados na fase aguda unicamente pelo resultado da qPCR. A relação entre dias com sintomas à admissão, carga bacteriana e título recíproco de MAT está apresentada na Figura 16.

O tempo médio de hospitalização dos pacientes foi de $10,0 \pm 7,6$ dias. Entretanto, pacientes que foram a óbito ($n=17$) permaneceram internados por um período significativamente mais curto ($5,0 \pm 8,0$ dias; $P<0,05$), enquanto o período de internação foi significativamente mais longo para aqueles que desenvolveram LPHS ($22,0 \pm 14,5$ dias; $P<0,05$). 15,7% ($n=44$) dos 280 pacientes foram admitidos na UTI, sendo o tempo médio de permanência de $9,4 \pm 8,9$ dias. Todos os pacientes que desenvolveram LPHS ($n=14$) foram admitidos na UTI, na qual permaneceram internados por, em média, 15 dias ($15,2 \pm 12,0$). Desses, seis (42,8%) foram a óbito após $10,8 \pm 11,3$ dias na UTI enquanto os oito (57,2%) pacientes que sobreviveram permaneceram na UTI por $18,5 \pm 12,2$ dias ($P<0,05$). A média geométrica da carga bacteriana para esses grupos foi 2.792 ± 13 vs. 32 ± 127 GEq/mL, respectivamente ($P<0,0001$).

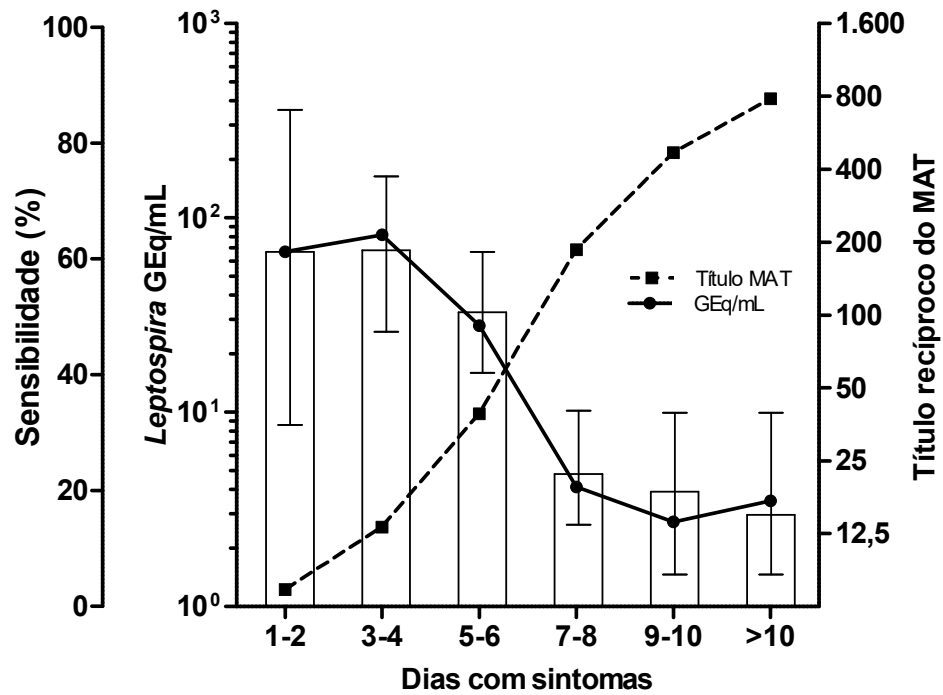


Figura 16 – Relação entre dias com sintomas (eixo x), sensibilidade da qPCR (1º eixo y), carga bacteriana (2º eixo y) e título recíproco de MAT (3º eixo y).

Tabela 11 – Características dos casos (n=280) incluídos na avaliação da correlação entre carga bacteriana, covariáveis de risco e desfechos.

Características	LPHS (n=14)		Não-LPHS (n=266)		Óbitos (n= 17)		Sobreviventes (n=263)	
	No.	No. (%) ou média (DP)	No.	No. (%) ou média (DP)	No.	No. (%) ou média (DP)	No.	No. (%) ou média (DP)
<i>Demográficas</i>								
Idade (anos)	14	39,8 (15,4)	266	35,4 (14,5)	17	45,3 (9,8)*	263	34,7 (14,6)
05-14	0	0	16	12,6 (3,3)	0	0	16	12,6 (3,3)
15-24	2	17,5 (2,1)	62	20,3 (2,8)	0	0	64	20,3 (2,8)
25-34	4	29,5 (3,5)	65	29,8 (2,8)	3	31,0 (3,6)	66	29,7 (2,8)
35-44	3	43,0 (1,0)*	47	39,2 (3,1)	6	41,8 (2,1)*	44	39,1 (3,1)
≥45	5	55,2 (10,2)	76	54,0 (6,5)	8	53,7 (6,9)	73	54,2 (6,7)
Sexo masculino	14	11 (78,6)	266	233 (87,6)	17	12 (70,6)*	263	232 (88,2)
<i>Apresentação clínica</i>								
Dias com sintomas	14	5,8 (2,4)	264	6,3 (3,4)	16	5,3 (1,9)	262	6,3 (3,6)
Febre	14	13 (92,9)	265	258 (97,4)	17	16 (94,1)	262	255 (97,3)
Sufusão conjuntival	14	5 (35,7)*	263	39 (14,8)	16	6 (37,5)*	261	38 (14,6)
Hipotensão	13	2 (15,4)	262	17 (6,5)	16	2 (12,5)	259	17 (6,6)
Icterícia	14	10 (71,4)	266	227 (85,3)	17	14 (82,4)	263	223 (84,8)
Oligúria	14	3 (21,4)	266	81 (30,5)	17	10 (58,8)*	263	74 (28,1)
Estado mental alterado	14	1 (7,1)	260	17 (6,5)	17	4 (23,5)*	257	14 (5,4)
Insuficiência respiratória	13	9 (69,2)*	265	63 (27,5)	16	9 (56,3)*	262	73 (27,9)
<i>Exames laboratoriais na admissão</i>								
Hematócrito (%)	14	29,2 (5,3)*	263	40,0 (5,9)	17	29,9 (6,0)*	260	34,0 (6,0)
<30	8	25,7 (3,2)	63	26,0 (3,9)	9	25,4 (3,2)	62	26,1 (3,9)
30-38	5	31,1 (1,6)*	140	33,8 (2,5)	5	32,6 (1,9)	140	33,7 (2,5)
>38	1	38,7 (-)	60	41,0 (2,3)	3	39,2 (0,32)	58	40,8 (2,4)

Contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$)	14	16,0 (8,1)	266	14,6 (6,9)	16	15,7 (10,5)	259	14,7 (6,7)
<10	3	9,4 (0,05)*	58	7,5 (2,0)	4	6,1 (2,8)	57	7,7 (1,9)
10 – 14,9	6	12,6 (2,0)	100	12,3 (1,4)	1	12,5 (1,9)	100	12,3 (1,4)
≥ 15	5	24,0 (8,7)	108	20,8 (6,6)	7	23,2 (11,8)	102	20,8 (6,3)
Contagem de plaquetas ($\times 10^9/L$)	14	54,0 (45,2)*	259	108,3 (87,9)	17	53,3 (40,5)*	256	109,0 (88,2)
<50	9	30,2 (12,3)	67	33,3 (10,6)	9	28,7 (9,8)	67	33,5 (10,8)
50-99	4	74,0 (15,4)	81	74,2 (14,2)	7	65,7 (11,5)*	78	75,0 (14,2)
≥ 100	1	118,0 (-)	111	178,4 (93,2)	1	118,0 (-)	111	178,4 (93,2)
Aspartato aminotransferase	14	191,0 (126,8)*	256	138,7 (123,4)	17	194,5 (131,6)*	253	137,8 (122,8)
Alanina aminotransferase	14	83,2 (62,2)	247	85,2 (77,8)	15	74,7 (39,0)	246	85,8 (78,7)
Bilirrubina direta (mg/dL)	11	13,5 (12,7)	184	10,0 (9,1)	13	14,2 (12,2)	182	9,9 (9,0)
<5	3	2,0 (1,5)	63	1,7 (1,6)	3	3,5 (0,3)*	63	1,7 (1,6)
5-15	4	10,0 (3,0)	86	9,8 (3,3)	5	8,8 (3,6)	85	9,8 (3,2)
≥ 15	4	25,7 (14,6)	54	20,3 (9,1)	5	26,1 (11,6)*	53	20,1 (11,7)
Potássio sérico (mEq/L)	13	3,9 (0,6)	237	3,8 (0,7)	15	3,7 (0,7)	235	3,8 (0,7)
Uréia (mg/dL)	14	135,8 (85,7)	264	119,1 (84,0)	17	145,3 (90,3)	261	118,3 (83,5)
Creatinina sérica (mg/dL)	14	3,4 (2,1)	264	3,7 (4,4)	16	3,3 (1,6)	262	3,7 (4,7)
<i>Carga de Leptospira (log; GEq/mL)</i>	14	2,3 (2,0)*	266	1,7 (1,0)	17	3,6 (1,1)*	263	1,7 (1,0)
<i>Evolução clínica</i>								
Dias de hospitalização	14	22 (14,5)*	266	9 (6,2)	17	5 (8,0)*	263	10 (6,5)
Diálise	14	11 (78,6)*	266	65 (24,4)	17	9 (52,3)*	263	67 (25,5)
Transfusão (concentrado de hemácias)	14	12 (85,7)*	266	31 (11,7)	17	5 (29,4)*	263	38 (14,4)
Admissão na UTI	14	14 (100,0)*	266	30 (11,3)	17	8 (47,1)*	263	36 (13,7)
Ventilação mecânica	14	14 (100,0)*	266	10 (3,8)	17	10 (58,8)*	263	14 (5,3)
Uso de O ₂	14	14 (100,0)*	266	74 (27,8)	17	16 (94,1)*	263	72 (27,4)

*P<0,1 para comparação entre os grupos LPHS e não-LPHS; e óbitos e sobreviventes.

5.2.3 Identificação de covariáveis de risco para desfechos graves

As características apresentadas na Tabela 11 como covariáveis de evolução clínica fazem parte da cadeia causal entre a exposição de interesse (carga de *Leptospira* na admissão), sua interação com as covariáveis de risco e os desfechos clínicos de interesse. Portanto, mesmo que suas diferenças entre os grupos tenham sido estatisticamente significativas, as mesmas não foram incluídas nos modelos logísticos multivariados (Tabelas 12 e 13). A mesma situação foi observada para exclusão da variável “insuficiência respiratória” dos modelos univariado e multivariado para identificação de fatores de risco para LPHS. Adicionalmente, mesmo que não tenham sido identificados como variáveis de risco, os modelos logísticos multivariados iniciais foram controlados para sexo e idade.

Foram identificadas oito covariáveis cujas diferenças foram significativas entre os grupos LPHS e não-LPHS. Após análise logística univariada, as covariáveis sufusão conjuntival, contagem de plaquetas, hematócrito e carga bacteriana foram identificadas como fatores de risco significativos para predição do desenvolvimento de LPHS, dentre os quais o preditor mais forte foi sufusão conjuntival. Essas covariáveis de risco foram incluídas no modelo logístico multivariado (controlando para sexo e idade). O modelo multivariado final identificou a carga bacteriana (OR=1,57; CI 95% 1,12-2,24) como fator de risco independentemente associado ao desenvolvimento de LPHS. A mesma análise revelou que hematócrito foi um fator protetor (OR=0,88; CI 95% 0,81-0,96).

Dos 11 fatores de risco associados ao óbito por leptospirose, oito foram identificados como tendo associação significativa através de análise logística univariada. Esses fatores foram incluídos no modelo logístico multivariado, que revelou cinco fatores de risco independentemente associados ao óbito em decorrência da leptospirose. Dentre esses, a maior associação foi observada para idade entre 35 e 44 anos (OR=11,11; IC 95% 1,95-81,86), seguida de oligúria (OR=8,89; IC 95% 2,15-47,62), insuficiência respiratória (OR 6,56; IC 95% 1,61-34,05) e carga bacteriana (OR=6,05; IC 95% 2,98-17,02). Novamente, hematócrito foi identificado como fator protetor (OR=0,83; 0,73-0,93).

Tabela 12 – Identificação de fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome de Hemorragia Pulmonar associada à Leptospirose (LPHS).

Características	Razão de chances (IC 95%)	
	Modelo Univariado	Modelo Multivariado
<i>Demográficas</i>		
Idade 35-44 anos	1,27 (0,28-4,26)	-
Sexo masculino	0,51 (0,15-2,38)	-
<i>Apresentação clínica</i>		
Sufusão conjuntival	3,19 (0,94-9,75)*	-
<i>Exames laboratoriais</i>		
Contagem de leucócitos <10 ($\times 10^9/L$)	0,97 (0,22-3,25)	-
Contagem de plaquetas ($\times 10^9/L$)	0,99 (0,99-1,00)*	-
Hematócrito (%)	0,88 (0,81-0,96)*	0,88 (0,81-0,96)
Aspartato aminotransferase (UI/mL)	1,00 (0,99-1,00)	-
<i>Carga de Leptospira (log; GEq/mL)</i>	1,56 (1,12-2,21)*	1,57 (1,12-2,24)

*P<0,1 no modelo univariado

Tabela 13 – Identificação de fatores de risco para óbito em decorrência da leptospirose.

Características	Razão de chances (IC 95%)	
	Modelo Univariado	Modelo Multivariado
<i>Demográficas</i>		
Idade 35-44 anos	2,71 (0,89-7,53)*	11,11 (1,95-81,86)
Sexo masculino	0,32 (0,11-1,06)*	-
<i>Apresentação clínica</i>		
Sufusão conjuntival	3,52 (1,14-10,06)*	-
Oligúria	3,64 (1,35-10,39)*	8,89 (2,15-47,62)
Estado mental alterado	3,74 (0,98-11,75)*	-
Insuficiência respiratória	3,64 (1,35-10,39)*	6,56 (1,61-34,05)
<i>Exames laboratoriais</i>		
Contagem de plaquetas 50-99 ($\times 10^9/L$)	1,66 (0,58-4,48)	-
Bilirrubina sérica direta ≥ 15 (mg/dL)	2,14 (0,62-6,80)	-
Hematócrito (%)	0,90 (0,84-0,97)*	0,83 (0,73-0,93)
Aspartato aminotransferase (UI/mL)	1,00 (0,99-1,00)	-
<i>Carga de Leptospira (log; GEq/mL)</i>	3,21 (2,08-5,56)*	6,05 (2,98-17,02)

*P<0,1 no modelo univariado

5.2.4 Determinação dos pontos de corte prognósticos

Para determinar os valores de corte prognósticos associados ao desenvolvimento de LPHS ou óbito, foi realizada análise ROC. Pacientes que desenvolveram o desfecho de interesse foram tratados como casos, enquanto os que não desenvolveram os desfechos foram tratados como controles. O critério utilizado para determinar os pontos de corte foi o valor de carga bacteriana que ofereceu o melhor balanço entre sensibilidade e especificidade, de modo que os valores nominais e seus intervalos de confiança ficassem idealmente acima de 50,0%.

As curvas ROC para LPHS e óbito estão representadas na Figura 17. Para LPHS, o ponto de corte foi estabelecida em 159 GEq/mL, alcançando sensibilidade de 64,3% (IC 95% 35,1-87,2%) e especificidade de 68,8% (62,8-74,3%). A área sob a curva mostrou uma probabilidade de 68,0% ($P < 0,05$), de obter quantificações mais altas para pacientes com LPHS do que para pacientes sem LPHS, sendo uma medida da acurácia do teste na predição do desenvolvimento de LPHS. Para óbito, a linha de corte foi estabelecida em 1.181 GEq/mL, apresentando sensibilidade de 76,5% (IC 95% 50,1-93,2%) e especificidade de 89,3% (IC 95% 85,0-92,8%). A área sob a curva apontou uma acurácia de 88,3% ($P < 0,0001$) para a observação de valores de carga bacteriana mais alta entre óbitos do que entre sobreviventes.

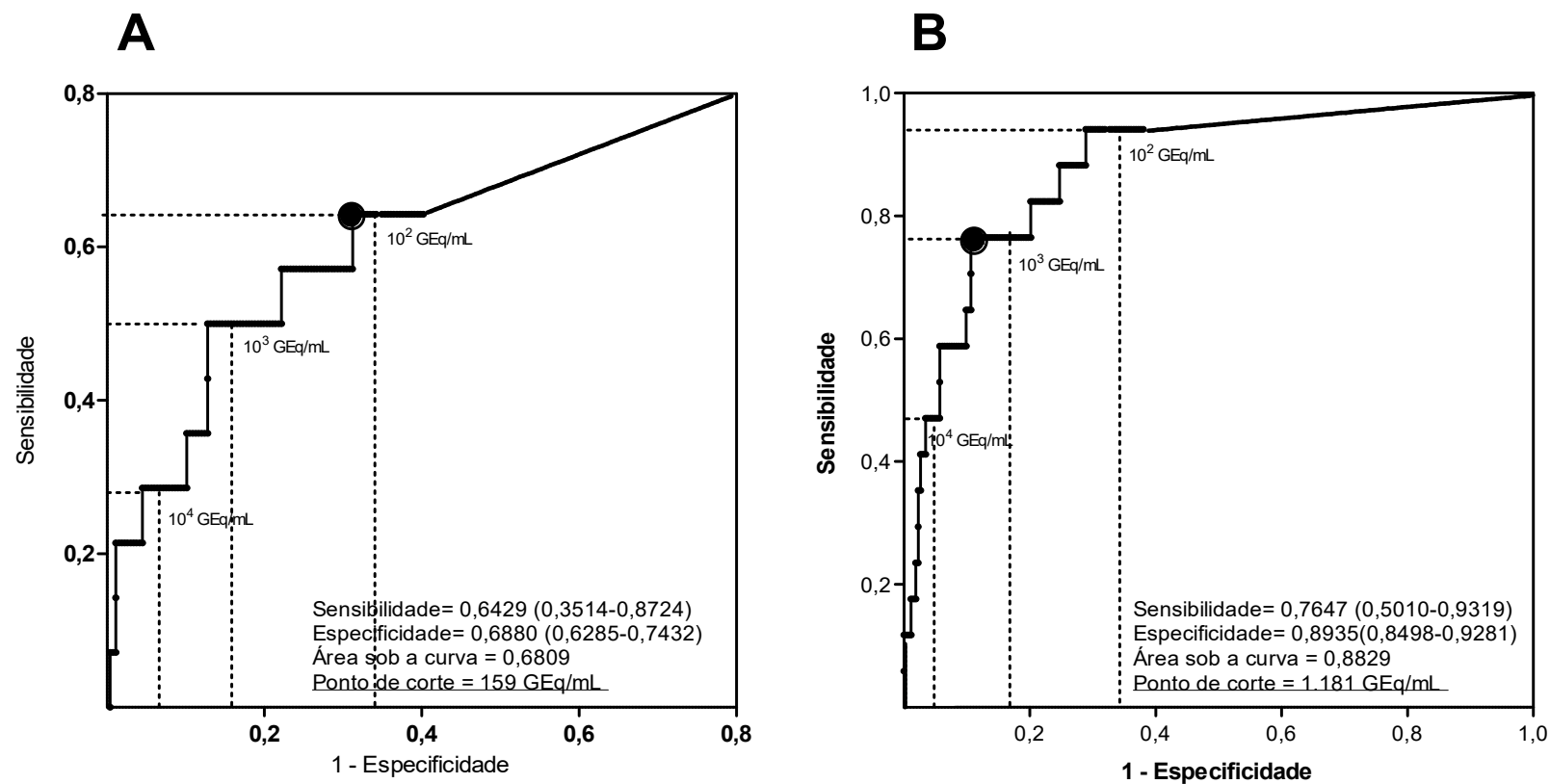


Figura 17 – Curvas ROC para determinação do ponto de corte da carga bacteriana associado ao desenvolvimento de LPHS (A) ou óbito (B). Os pontos de corte estão evidenciados nos painéis por um círculo preto.

5.3 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

5.3.1 Seleção do kit para extração de DNA

Os resultados dos experimentos realizados para comparar o desempenho dos três kits comerciais para extração de DNA a partir de amostras de água artificialmente contaminadas com 1×10^5 leptospiras/mL estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 – Avaliação da eficiência da extração de DNA a partir de quatro matrizes de água contaminadas artificialmente com leptospiras, usando três kits comerciais.

Matriz de água	média log <i>Leptospira</i> GEq/ml \pm DP		
	PowerWater DNA Isolation Kit	QIAamp DNA Mini Kit	PowerSoil DNA Isolation Kit
Ultrapura	4,62 \pm 0,29	3,27 \pm 0,20	3,33 \pm 0,03
Rio	4,65 \pm 0,01	4,56 \pm 0,16	3,71 \pm 0,18
Lago	3,91 \pm 0,12	0	4,17 \pm 0,13
Esgoto	1,90 \pm 0,94	0,68 \pm 0,95	3,37 \pm 0,02

O PowerWater DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA) forneceu melhor recuperação de DNA do que o QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) e o PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA) para as amostras de água de rio e água ultrapura. Contudo, o último kit apresentou a melhor eficiência para extração de DNA das amostras mais ricas em material particulado em suspensão (água de lago e esgoto), apresentando também a menor variabilidade na recuperação de DNA para os quatro tipos de matrizes de água, entre os três kits avaliados. Portanto, o PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA) foi selecionado para uso nos experimentos seguintes.

5.3.2 Seleção do protocolo de concentração

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados de recuperação do DNA de *Leptospira* obtidos pelo uso de dois protocolos distintos de centrifugação para concentração das matrizes de água artificialmente contaminadas com 1×10^5 leptospiros/mL.

Ambos os protocolos resultaram em recuperação de DNA proporcionalmente menor do que a obtida para as alíquotas de 200 μ L, que foram submetidas à extração de DNA sem centrifugação prévia ($P < 0,05$), sugerindo perda de bactérias durante o processo de concentração. Para todas as matrizes exceto água de rio, a diferença entre a quantidade média de DNA de *Leptospira* recuperada a partir dos dois protocolos de centrifugação não foi estatisticamente significativa. Entretanto, visto que a quantidade de DNA de *Leptospira* recuperada a partir de água de rio foi maior para o protocolo B, esse protocolo foi selecionado para uso nos experimentos subsequentes.

Tabela 15 – Impacto de diferentes protocolos de centrifugação na recuperação do DNA de leptospiros a partir de quatro matrizes de água contaminadas artificialmente.

Matriz de água	média log <i>Leptospira</i> GEq/ml \pm DP			
	Sem centrifugação*	Protocolo de Centrifugação		
		A†	B‡	Valor P
Ultrapura	4,92 \pm 0,15	3,34 \pm 0,17	3,42 \pm 0,09	0,5360
Rio	4,39 \pm 0,02	3,35 \pm 0,01	3,77 \pm 0,07	0,0005
Lago	4,50 \pm 0,01	4,20 \pm 0,09	4,18 \pm 0,08	0,7950
Esgoto	4,25 \pm 0,12	3,58 \pm 0,07	3,44 \pm 0,05	0,0512

*DNA foi extraído de 200 μ L de amostra, sem etapa prévia de centrifugação. Dados incluídos para comparação e não considerados na análise estatística.

†Alíquotas de 40 mL foram centrifugadas a 3.000 \times g por 20 min a TA. Os sedimentos foram submetidos à extração de DNA.

‡ Alíquotas de 40 mL foram centrifugadas a 15.000 \times g por 20 min a 4°C. Os sedimentos foram submetidos à extração de DNA.

Nessa etapa foi avaliado o impacto da adição de diferentes quantidades de *E. coli* sobre a recuperação de DNA de *Leptospira* a partir de alíquotas de água ultrapura artificialmente contaminadas com 1×10^5 leptospiros/mL. Apesar de não ter havido diferenças significativas na recuperação de DNA de *Leptospira* a partir do controle negativo em adição de *E. coli* ou alíquotas contaminadas com 1×10^5 ou 1×10^6 *E.*

coli/mL, a adição de 1×10^7 *E. coli*/mL aumentou consideravelmente a recuperação de DNA de *Leptospira* (Figura 18). Não foi detectado amplificação no controle negativo, contaminado apenas com *E. coli* (1×10^5 /mL). O resultado obtido com água ultrapura foi extrapolado para as demais matrizes de água (exceto esgoto), de modo que foram adicionadas 1×10^7 *E. coli*/mL às alíquotas de todas as matrizes de água (exceto esgoto) nos experimentos seguintes.

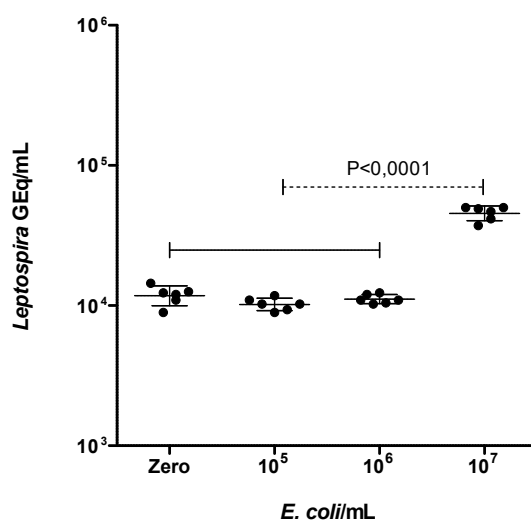


Figura 18 – Efeito da contaminação artificial com diferentes quantidades de *E. coli* sobre a recuperação do DNA de *Leptospira*.

5.3.3 Determinação do volume inicial de amostra

Para cada uma das quatro matrizes de água avaliadas, foi extraído DNA a partir de alíquotas de 40, 80, 200 e 400 mL para investigar o impacto do volume inicial de amostra sobre a quantificação final da carga bacteriana.

Para todas as matrizes exceto água de lago, a quantificação do DNA por qPCR a partir de DNA extraído de 40 ou 80 mL não foi significativamente diferente ($P > 0,05$), conforme ilustrado na Figura 19. No entanto, a quantificação do DNA de *Leptospira* a partir das alíquotas de 40 mL foi significativamente maior do que aquelas obtidas para as alíquotas de 200 e 400 mL, para as quatro amostras. Assim, o aumento no volume inicial de amostra foi inversamente proporcional à quantificação final do DNA de *Leptospira* por qPCR.

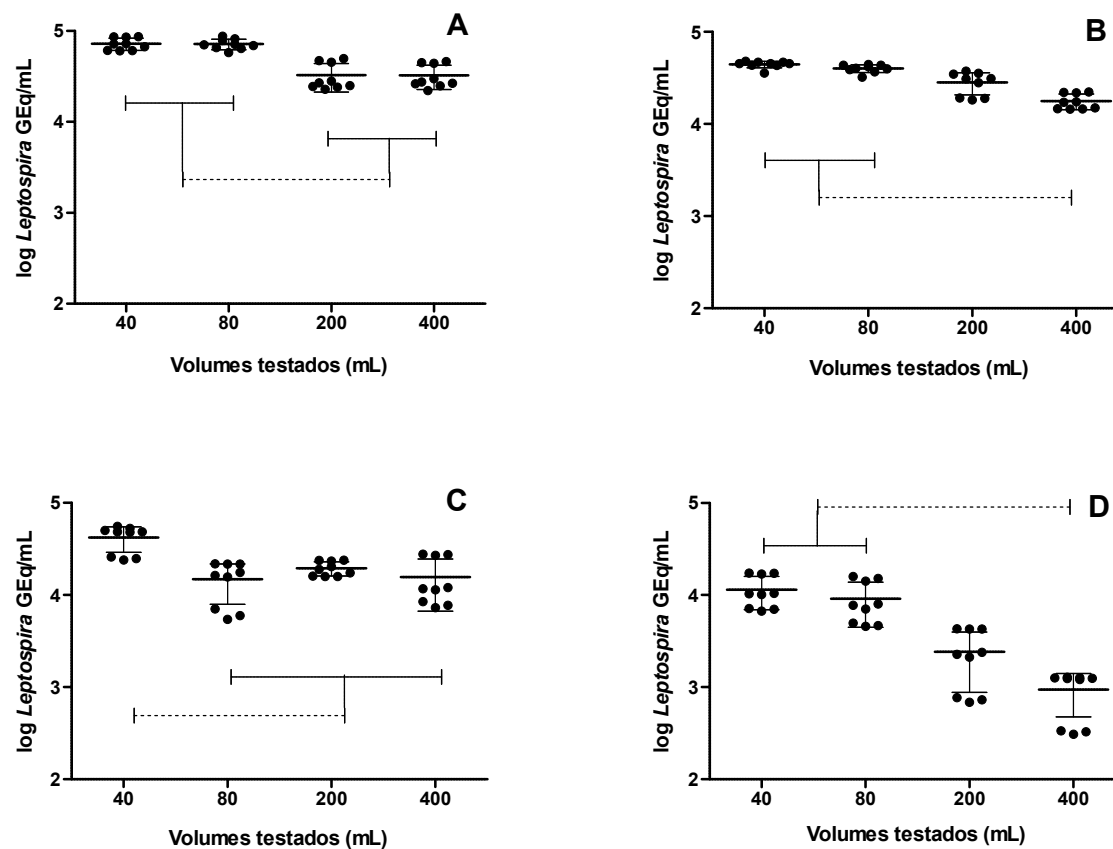


Figura 19 – Seleção do volume inicial de amostra ambiental para quantificação do DNA de *Leptospira* por qPCR.

Os painéis mostram resultados obtidos na análise de água ultrapura (A), água de rio (B), água de lago (C) e esgoto (D). As amostras foram artificialmente contaminadas com 10^5 *Leptospira*/mL e 10^7 *E. coli*/mL (exceto esgoto). As barras de erro representam a média geométrica \pm DP geométrico. As linhas pontilhadas unem grupos cuja diferença de quantificação foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Linhas contínuas conectam grupos cuja diferença de quantificação não foi significativa.

5.3.4 Determinação do efeito de matriz e sensibilidade analítica

O LMD foi determinado a partir de alíquotas de 40 mL para cada matriz de água. As alíquotas foram artificialmente contaminadas com 1×10^6 leptospiros/mL e diluídas 1:10 até 1×10^0 leptospiros/mL. Como determinado anteriormente, foram adicionadas 1×10^7 *E. coli*/mL às alíquotas de todas as amostras, exceto esgoto. Para controlar o efeito sinérgico da adição de *E. coli* sobre a recuperação do DNA de *Leptospira*, foi incluída uma diluição seriada de *Leptospira* em água ultrapura não contaminada com *E. coli*. A Figura 20 mostra a correlação entre a quantidade de leptospiros usadas na contaminação artificial e a respectiva quantificação final do DNA por qPCR. Todas as matrizes avaliadas apresentaram coeficiente de correlação de Pearson (r) igual ou superior a 0,97. Para as cinco séries de diluição avaliadas, o LMD com 95% de *hit-rate* variou de 11 GEq/mL (para água ultrapura com adição de *E. coli*) a 1.624 GEq/mL (para água ultrapura sem adição de *E. coli*). Não foi possível calcular o LMD para água de rio uma vez que todas as nove replicatas testadas para todas as concentrações foram detectáveis por qPCR. Isso indicou que o LMD para água de rio possivelmente foi inferior a 1 GEq/mL.

A análise de covariância (ANCOVA) dos coeficientes angulares e lineares referentes às retas obtidas por regressão linear dos dados relativos a cada matriz de água revelou que todas foram estatisticamente distintas da linha de equivalência matemática (coeficiente angular=1,0; coeficiente linear=0,0). Apesar de a comparação dos coeficientes angulares ter revelado que algumas linhas foram paralelas entre si, a comparação dos coeficientes angulares mostrou que todas as linhas foram distintas (Tabela 16).

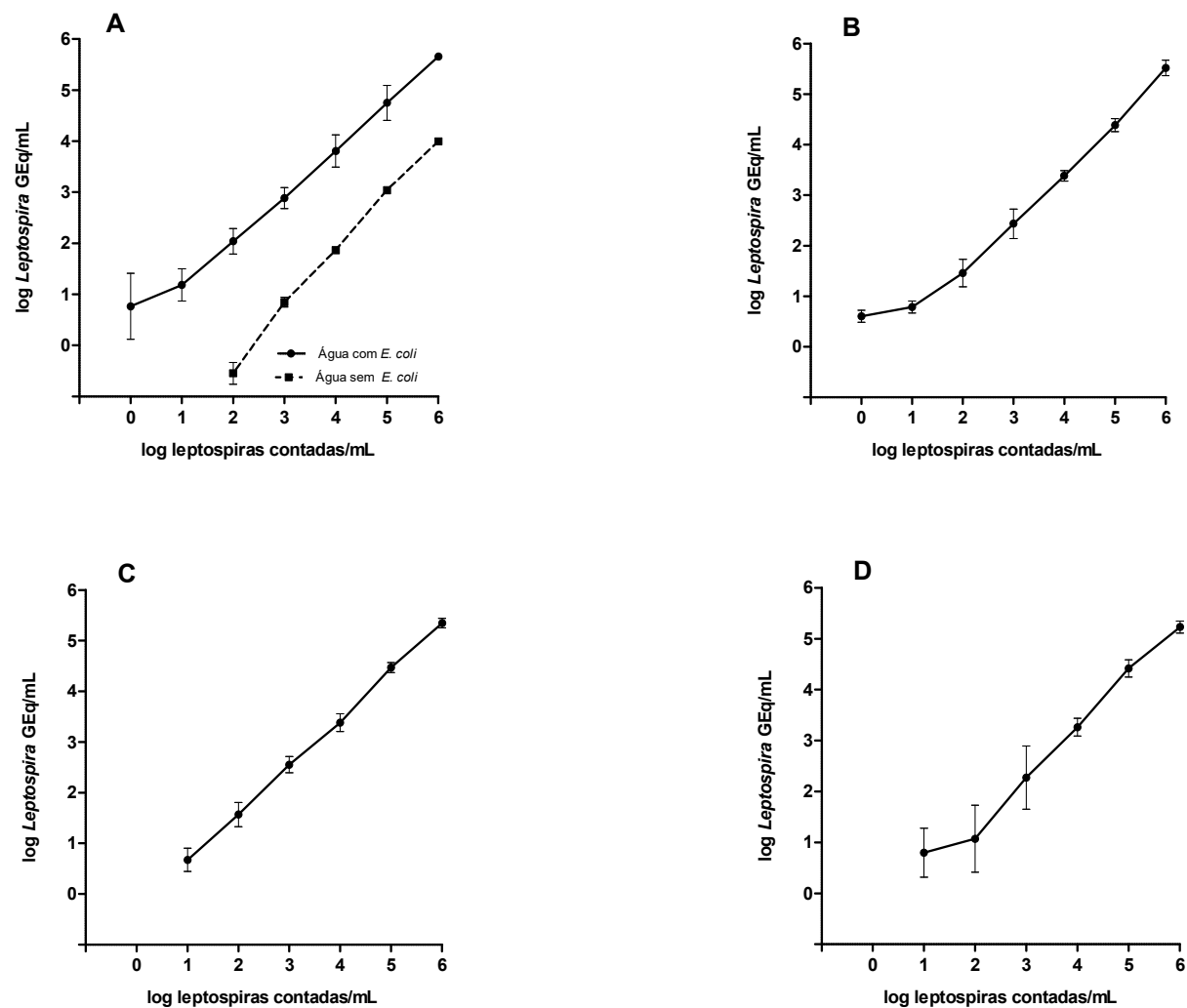


Figura 20 – Demonstração do intervalo de linearidade e do efeito de matriz para as diferentes matrizes de água ambiental. Os painéis mostram os resultados obtidos para amostras de água ultrapura (A), água de rio (B), água de lago (C) e esgoto (D). As barras de erro mostram a média geométrica \pm DP geométrico.

Tabela 16 – Limites mínimos de detecção calculados por análise probit e parâmetros matemáticos das retas obtidas por regressão linear a partir de dados de diluições seriadas de *Leptospira* em diferentes matrizes de água.

Matriz de água	LMD*	Parâmetros da linha de regressão		
		R ²	Coefficiente angular ± DP	Coefficiente linear ± DP
Ultrapura com <i>E. coli</i>	11	0,9613	0,8470 ± 0,0272	0,4632 ± 0,0993
Ultrapura sem <i>E. coli</i>	1.624	0,9924	1,1050 ± 0,0180	-2,559 ± 0,0825
Rio	<1	0,9640	0,8521 ± 0,0260	0,0975 ± 0,0939
Lago	19	0,9893	0,9401 ± 0,0170	-0,2924 ± 0,0671
Esgoto	52	0,9305	0,9792 ± 0,0481	-0,6230 ± 0,1949

*LMD calculado por análise de regressão probit para alcançar *hit-rate* de 95%; GEq/mL.

5.4 MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

5.4.1 Construção do controle interno

5.4.1.1. Produção do inserto

O produto de PCR usado como inserto para a produção do controle interno foi gerado por duas rodadas sequenciais de *overlapping extension* PCR, usando iniciadores parcialmente complementares na primeira rodada de PCR (P1-F e P2-R). O produto da primeira PCR (148 pb) foi usado como molde para geração do produto de PCR na segunda rodada, utilizando novamente a abordagem de complementaridade entre os iniciadores (P3-F complementar a P1-F; P4-R complementar a P2-R).

A Figura 21 mostra o produto de PCR do tamanho previsto (242 pb), revelado através de eletroforese horizontal em gel de agarose. Como os produtos de PCR foram gerados com *Pfx* DNA polimerase, tendo, portanto, extremidade abrupta, não foi necessário desfosforilá-los para que fossem usados como inserto e ligados ao vetor M13mp18.

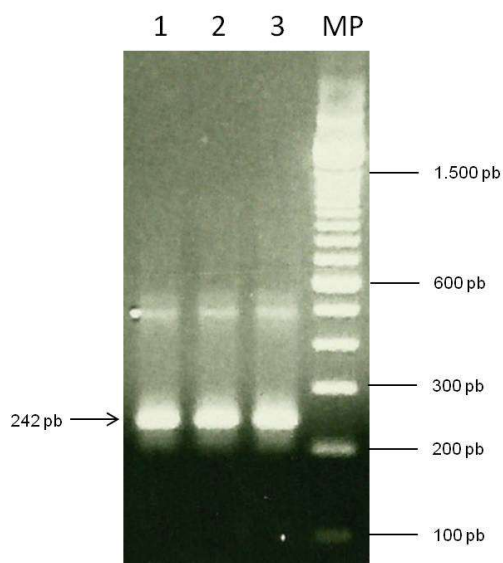


Figura 21 – Confirmação do produto de PCR gerado por *overlapping extension* PCR, usado como inserto para produção do controle interno. 1, 2 e 3 representam as replicatas técnicas do experimento. MP mostra o marcador de massa molecular.

5.4.1.2. Digestão do vetor

Para permitir a ligação do inserto gerado por *overlapping extension* PCR, o vetor M13mp18 foi digerido com a enzima de restrição *Sma* I (que gera extremidades abruptas), e posteriormente desfosforilado com SAP para evitar a recircularização. A seguir, alíquotas de vetor digerido (linearizado) e não digerido (circular) foram analisadas por corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 5% (Figura 22). Pode-se perceber que, devido a diferenças conformacionais, o vetor digerido apresentou menor mobilidade eletroforética do que o vetor não digerido, cuja estrutura conformacional é mais compacta.

Após confirmação da digestão e desfosforilação do vetor, o mesmo foi usado para ligação do inserto e transformação em *E. coli* TOP10F' quimicamente competente, cultivada simultaneamente com *E. coli* TOP10F' não competente em meio LB semissólido (*soft agar*).

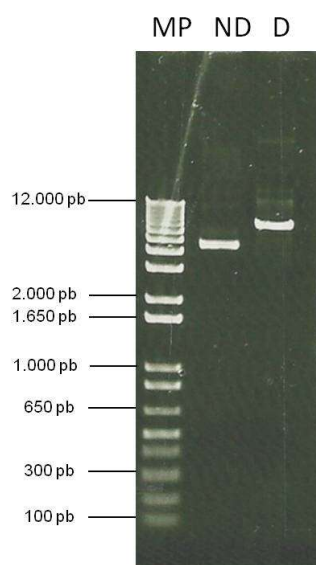


Figura 22 – Resultado da digestão do vetor M13mp18 com a enzima de restrição *Sma* I, com posterior desfosforilação com SAP. Marcador de massa molecular (MP), vetor não digerido (ND) e vetor digerido (D).

5.4.1.3. Confirmação da presença do inserto nas *plaques* positivas

O cultivo da cepa de *E. coli* quimicamente competente transformada com o vetor M13mp18 gerou *plaques* nas condições de cultura utilizadas. Após seleção de cinco *plaques* e extração do DNA simples-fita de uma delas, o mesmo foi amplificado com os iniciadores M13pUC-F e M13pUC-R em cinco replicatas técnicas para confirmar a presença do inserto. A Figura 23 mostra a corrida eletroforética dos produtos de PCR, confirmando a presença do produto de tamanho esperado (391 pb).

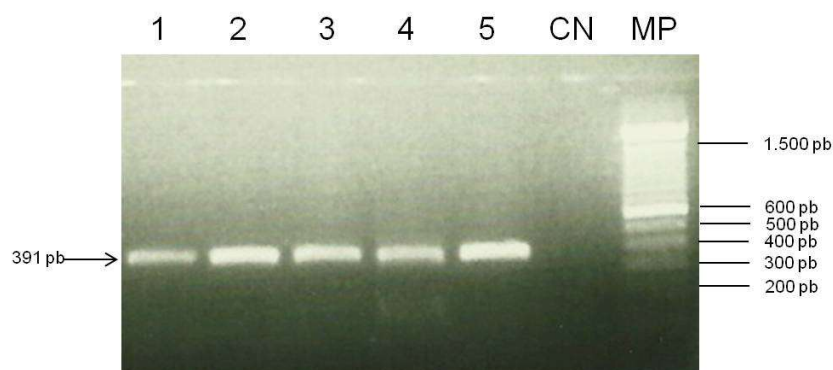


Figura 23 – Confirmação da presença do inserto em uma das *plaques* positivas selecionadas.

Os números 1 a 5 mostram as replicatas técnicas do experimento. CN representa o controle negativo de PCR e MP mostra o marcador de massa molecular.

5.4.1.4. Confirmação da sequência e orientação do inserto

Foi realizado o sequenciamento bidirecional das cinco replicatas técnicas do experimento anterior utilizando os iniciadores internos LipL32-45F e LipL32-286R. Após alinhamento das sequências-consenso foi observado que o inserto estava presente na orientação correta (5'-3') e que a sequência nucleotídica do sítio alterado por mutagênese sítio-dirigida estava preservada, permitindo o anelamento perfeito da sonda de hidrólise para detecção do *armored* DNA.

5.4.1.5. Otimização do uso do *armored* DNA como controle interno

A figura 25 apresenta o resultado do experimento para determinação da quantidade ótima de *armored* DNA a ser adicionada às amostras como controle interno de extração e amplificação. Tendo em vista a amplificação ser competitiva entre o gene *lipL32* e o controle interno, objetivou-se alcançar para o controle interno Ct superior a 33. Como pode ser notado, a amplificação do último ponto da diluição inicial alcançou Ct de 25, sem prejuízo à detecção do gene *lipL32* em sistema *duplex* (dados não apresentados). Assumindo a conservação da linearidade em diluições subsequentes, seria necessário diluir o último ponto (10^{-5} /mL) 1:100 (até 10^{-7} /mL) para alcançar o Ct desejado.

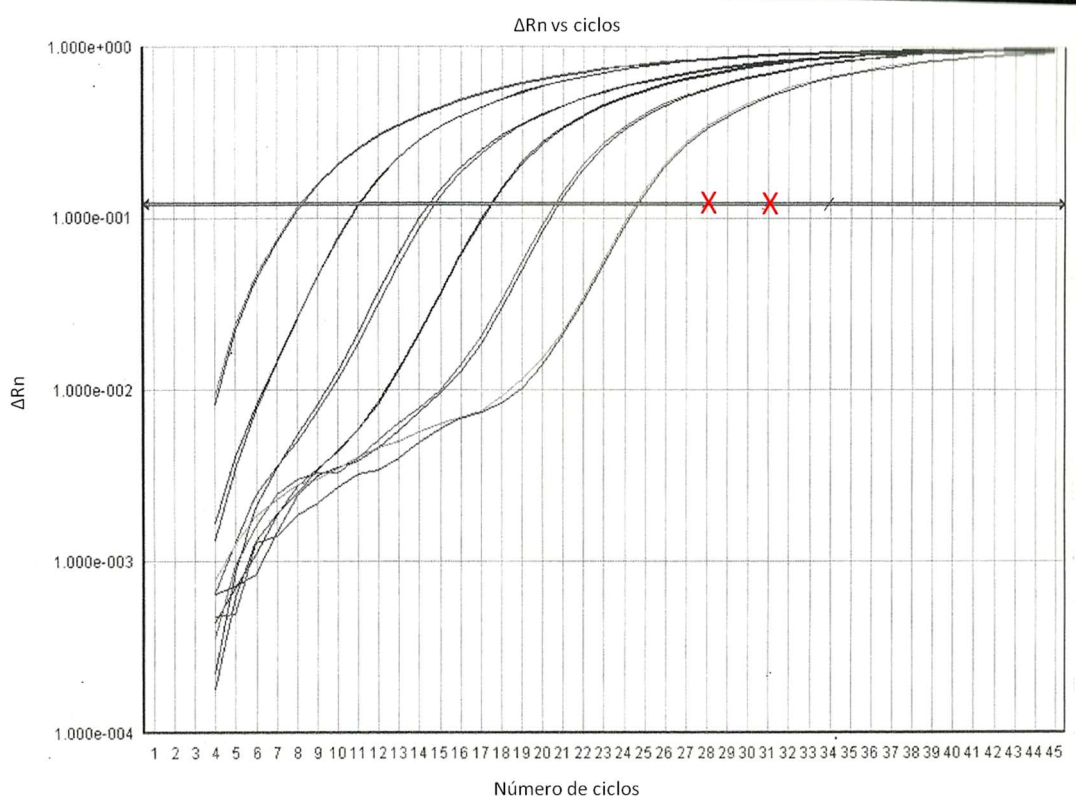


Figura 24 – Amplificação da diluição seriada 1:10 do *armored* DNA, até 10^{-5} /mL, usado como controle interno para as amostras ambientais.

As cruzes vermelhas mostram os valores de Ct esperados nas diluições 10^{-6} /mL (1:10) e 10^{-7} /mL (1:100), a partir do último ponto da diluição testada no experimento.

Todas as amostras ambientais contaminadas com a diluição 10^{-7} /mL do *armored* DNA apresentaram valor de Ct entre 34 e 38 para o controle interno, confirmando a lógica do raciocínio anterior. Os valores foram considerados aceitáveis, mas indicaram perda de material, presença de inibidores ou competição durante o processo de amplificação.

5.4.2 Coleta de amostras ambientais de água em Pau da Lima

Nos meses de julho e outubro de 2011 foram coletadas 265 amostras de esgoto e 252 amostras de água empoçada, totalizando 517 amostras para o estudo.

Inesperadamente, a média pluviométrica observada em 2011 nos meses que houve coleta de amostras foi bastante divergente do observado na série histórica de 1996 a 2009. Em julho, a série histórica apontava uma média pluviométrica de 195 mm^3 , mas

a precipitação foi de 81 mm³ em 2011. Da mesma maneira, a média pluviométrica histórica para o mês de outubro era 116 mm³, mas a precipitação foi de 230 mm³ em 2011. Portanto, foi necessário inverter os critérios de umidade (úmido, umidade intermediária) assumidos no desenho experimental para esses períodos: julho passou a ser considerado o período de umidade intermediária; e outubro foi considerado o período úmido.

5.4.3 Localização e frequência da detecção do DNA de *Leptospira* em amostras ambientais de água

Os resultados e dados de caracterização amostral estão sumarizados na Tabela 17. Dentre as 349 amostras coletadas no mês julho, 60 (17,2%) foram coletadas no cume, 97 (27,8%) em altitude intermediária e 192 (55,0%) no fundo de vale. A positividade foi de 9,7% (34/349) nesse período, sendo o maior número de amostras positivas referente ao fundo de vale (n=17; 50,0%). Dentre as 34 amostras positivas, 27 (79,4%) eram água de esgoto e sete (20,6%) eram água empoçada. A média geométrica da carga bacteriana entre todas as amostras foi $1,5 \pm 4,0$ GEq/mL, e entre as amostras positivas foi $93,0 \pm 3,0$ GEq/mL.

Entre as 168 amostras coletadas no mês de outubro, 24 (14,3%) foram coletadas no cume, 48 (28,6%) em altitude intermediária e 96 (57,1%) no fundo do vale. Dentre as 27 amostras positivas (16,0%), 20 (74,1%) eram água de esgoto e sete (25,9%) eram água empoçada. A média da carga bacteriana para todas as amostras foi $2,69 \pm 8,51$ GEq/mL, e $245,5 \pm 2,19$ GEq/mL para as amostras positivas.

Das 288 amostras coletadas no fundo de vale (55,7 % do total), 12,8% (n=37) foram positivas, com média geométrica da carga bacteriana de $1,35 \pm 2,14$ GEq/mL. Para as amostras coletadas em altitude intermediária (28,0%; 145/517), foi observada positividade de 7,6%, com média geométrica da carga bacteriana de $5,75 \pm 1,82$ GEq/mL. Já para as amostras coletadas nos cumes (16,2%; 84/517) a positividade foi de 15,5% com carga bacteriana média de $1,41 \pm 2,29$ GEq/mL. As diferenças relativas à altitude não foram significativas.

Tabela 17 – Características amostrais e resultados obtidos para quantificação do DNA de leptospiros patogênicas em amostras ambientais de água.

Parâmetros	Julho/2011			Outubro/2011		
	Total	Positividade %	GEq/mL	Total	Positividade %	GEq/mL
<i>Tipo de água</i>						
Esgoto	181	14,9*	1,89 ± 4,80	84	23,8*	4,07 ± 11,63
Empoçada	168	4,2	1,25 ± 3,08	84	8,3	1,72 ± 5,25
<i>Período de coleta</i>						
Manhã	175	13,7*	1,90 ± 5,27	84	26,2*	4,41 ± 12,61
Tarde	174	5,7	1,27 ± 2,73	84	6,0	1,45 ± 3,68
<i>Altitude</i>						
Cume	60	16,7	2,01 ± 5,59	24	12,5	2,06 ± 6,70
Intermediária	97	7,2	1,35 ± 3,05	48	8,3	1,63 ± 4,84
Fundo de vale	192	8,9	1,52 ± 4,02	96	20,8	3,82 ± 11,27

5.4.4 Associação entre a matriz ambiental de água e a detecção de DNA de *Leptospira*

Dentre as 265 amostras de esgoto avaliadas no estudo, foi detectado DNA de leptospiros patogênicas em 47 (17,7%), com média geométrica da carga bacteriana de $2,34 \pm 6,60$ GEq/mL. A positividade entre as amostras de água empoçada foi de 5,6% (14/252), com carga bacteriana média de $1,38 \pm 3,70$ GEq/mL. A diferença de positividade observada entre as matrizes de água foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

5.4.5 Quantificação do DNA de *Leptospira* em amostras ambientais de água

A média geométrica da carga bacteriana foi $2,40 \pm 6,76$ GEq/mL em amostras de esgoto e $1,38 \pm 3,71$ GEq/mL em amostras de água empoçada ($P < 0,05$). Tanto a positividade (17,8%, 46/259 vs 5,8%; 15/258) quanto a carga bacteriana média ($2,51 \pm 4,1$

vs $1,32 \pm 2,95$ GEq/mL) foram significativamente mais altas entre as amostras coletadas pela manhã em relação às aquelas coletadas à tarde ($P < 0,05$). Apesar do maior valor de carga bacteriana observado ter sido $3,63 \times 10^3$ GEq/mL, 36,0% (22/61) das amostras positivas tiveram cargas bacterianas menores do que 100 GEq/mL. Foi observada uma proporção significativamente maior de amostras positivas com cargas bacterianas proporcionalmente mais altas em amostras de esgoto, coletadas no período úmido (outubro) ($P < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 26.

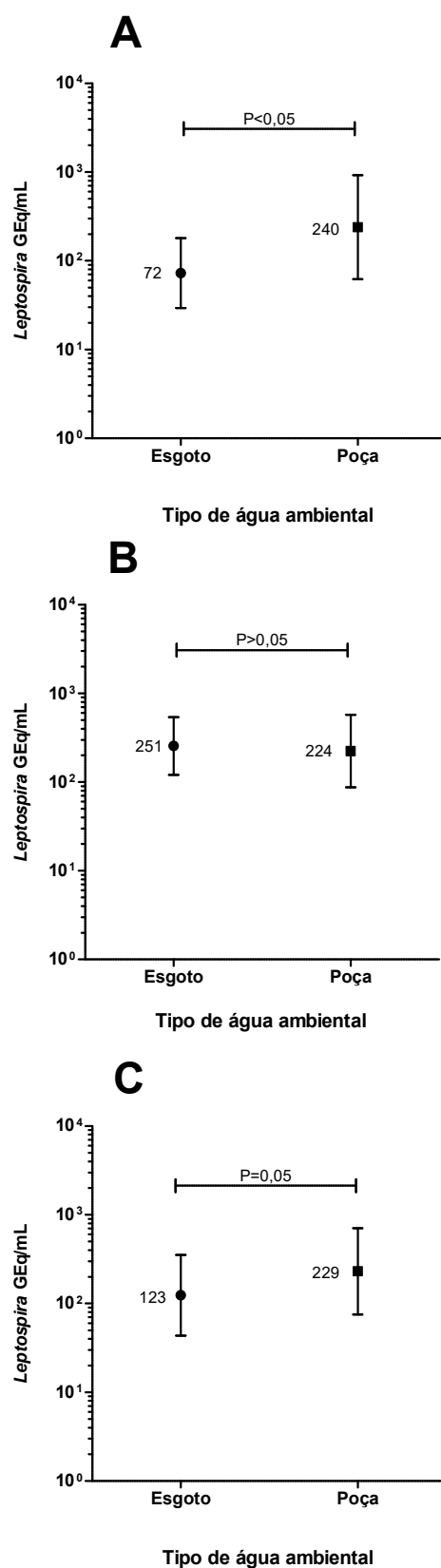


Figura 25 – Média geométrica da quantificação (\pm DP) de DNA de *Leptospira* em amostras de água ambientais positivas por qPCR coletadas em julho (A) e outubro (B) de 2011. O Painel C mostra a média geométrica das amostras dos dois períodos.

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE MÉTODO BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE HUMANA

Os métodos de PCR em tempo real tornaram-se um marco para o diagnóstico precoce de doenças infecciosas, incluindo aquelas causadas por organismos fastidiosos como *Leptospira*. Apesar de limitações de custo, a PCR em Tempo Real oferece consideráveis vantagens sobre os métodos convencionais sorológicos e microbiológicos utilizados para diagnosticar a leptospirose. Essa tecnologia reduz o tempo necessário para a execução do teste e exibe maior sensibilidade e especificidade quando sondas marcadas com fluoróforos são utilizadas. Isso também permite que a PCR seja realizada sem nenhum passo de manipulação pós-PCR, reduzindo significativamente o tempo de processamento e o risco de contaminação cruzada entre as amostras. Nessa etapa do estudo, foi realizada a avaliação da acurácia diagnóstica de um método de PCR em tempo real previamente descrito na literatura para a detecção de leptospiras em amostras clínicas humanas.

O método previamente descrito (STODDARD *et al.*, 2009) foi modificado para se adequar a um equipamento diferente, assegurando detecção apropriada de baixas concentrações de DNA de leptospiras. A sensibilidade analítica foi determinada utilizando DNA extraído de cultura de *Leptospira* e quantificado por espectrofotometria. Essa abordagem foi selecionada por ser mais acurada e menos subjetiva do que a utilização de DNA extraído de cultura quantificada por câmara de contagem de Petroff-Hausser (SMYTHE *et al.*, 2002) e menos propenso à contaminação do que o uso de plasmídeos altamente concentrados contendo a sequência-alvo (SLACK *et al.*, 2007; PALANIAPPAN *et al.*, 2005). A sensibilidade analítica calculada por análise probit foi de 2,8 GEq/reação, a qual foi muito semelhante aos 3,0 GEq/reação assumidos como menor valor teórico possível de LMD para métodos quantitativos baseados em PCR em Tempo Real (BUSTIN *et al.*, 2009). Esse valor de LMD também foi equivalente ao previamente relatado em publicações de métodos semelhantes (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2007; LEVETT *et al.*, 2005; MERIEN *et al.*, 2005;

PALANIAPPAN *et al.*, 2005; SMYTHE *et al.*, 2002). Quando os protocolos de extração de DNA e de amplificação por PCR usados neste estudo foram considerados, obteve-se uma detecção de 2,8 GEq/reação, o que equivalente à concentração de 280 leptospiros por mL de amostra, assumindo-se eficiência de 100% na extração. Se potenciais inibidores presentes nas amostras clínicas também forem levados em consideração, é improvável que o LMD determinado nos experimentos de contaminação artificial com *Leptospira* de amostras obtidas de doadores sadios possa ser extrapolado para amostras de pacientes com suspeita de leptospirose. Deste modo, futuros estudos deveriam ser focados na otimização do processamento de amostras e extração de DNA com o objetivo de aumentar a recuperação de DNA de leptospiros. A especificidade analítica não foi avaliada novamente por ter sido previamente determinada para os oligonucleotídeos utilizados nesse estudo (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011; STODDARD *et al.*, 2009). Os parâmetros analíticos avaliados (intervalo de linearidade, sensibilidade analítica, precisão e acurácia) atingiram os parâmetros gerais estabelecidos para uso diagnóstico de testes baseados em PCR em tempo real utilizando sistemas *in-house* (BURD, 2010).

De acordo com os dados deste estudo, baixas concentrações de *Leptospira* foram detectadas quando o DNA foi extraído de amostras de soro, em comparação com amostras de sangue total em EDTA. Este fato foi previamente demonstrado para amostras contaminadas artificialmente (BOURHY *et al.*, 2011; STODDARD *et al.*, 2009; KOSITANONT *et al.*, 2007), e foi observado tanto nos nossos experimentos de contaminação artificial quanto na avaliação de amostras clínicas. Amostras de soro contaminadas artificialmente produziram concentrações de DNA de *Leptospira* consistentemente mais baixas do que o esperado a partir da quantidade nominal utilizada para a contaminação. Esse efeito de matriz não foi observado nos resultados obtidos a partir de amostras água e de sangue total em EDTA experimentalmente contaminadas. Essa observação foi corroborada pelos nossos resultados de acurácia diagnóstica, uma vez que 60,5% dos casos confirmados foram detectados por PCR em tempo real a partir da análise de amostras de sangue total, em comparação com 29,8% de positividade para as amostras de soro equivalentes. Como previamente postulado (STODDARD *et al.*, 2009; KOSITANONT *et al.*, 2007), uma das razões para a maior positividade em amostras de sangue total pode ser a internalização de leptospiros por leucócitos circulantes. Além disso, leptospiros são conhecidas por serem bactérias aderentes às células (BAROCCHI *et al.*, 2002) e poderiam ser, portanto, aprisionadas no coágulo o que dificultaria a detecção de concentrações baixas de DNA de *Leptospira* em amostras de soro.

O diagnóstico precoce é de suma importância no manejo clínico da leptospirose, pois a terapia antimicrobiana é mais efetiva quando iniciada na fase aguda da doença (LEVETT, 2001; FAINE *et al.*, 1999). O presente estudo demonstrou que o DNA de *Leptospira* pode ser detectado com segurança através da PCR em tempo real nos primeiros seis dias de doença, após os quais a positividade diminui. Nessa etapa do estudo, todos os pacientes de cujas amostras houve isolamento de *Leptospira* tiveram resultados detectáveis por PCR em tempo real. Isso sugere que a PCR em tempo real pode ser utilizada para direcionar a inoculação das amostras em meio de cultura, particularmente em laboratórios que realizam o isolamento a partir de amostras de sangue total coletado em heparina (WUTHIEKANUN *et al.*, 2007). Nesta situação, o meio de cultura poderia ser inoculado somente com amostras que fossem previamente positivas quando testadas por PCR em tempo real. Essa abordagem reduziria significativamente o trabalho e os custos associados com o isolamento de leptospirosas.

Embora nessa etapa não tenha sido realizada a análise quantitativa, foi observado que os valores de Ct foram significativamente mais baixos para os pacientes de cujas amostras houve isolamento de *Leptospira*. Este achado sugere que a carga bacteriana necessária para o isolamento possa ser mais alta do que aquela necessária para um resultado detectável por PCR em tempo real. Resultados similares foram descritos em estudos nos quais a PCR em tempo real foi utilizada tanto para propósitos qualitativos (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2009) quanto quantitativos (SLACK *et al.*, 2007; MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005; TRUCCOLO *et al.*, 2001).

Como previamente descrito (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2009), foi observada uma baixa sensibilidade diagnóstica para o método baseado em PCR em tempo real quando comparado com o MAT. Como a janela diagnóstica difere para os métodos moleculares e sorológicos durante o curso da doença, uma explicação plausível poderia ser a apresentação clínica tardia. É sabido que a carga bacteriana atinge o nível máximo durante os primeiros dias de doença e em seguida progressivamente decai até torna-se indetectável, enquanto os títulos de anticorpos específicos aumentam devido à estruturação da resposta imune do hospedeiro (KO *et al.*, 2009; MERIEN *et al.*, 2005). Os pacientes recrutados para essa etapa do estudo tinham em média 6,8 dias com sintomas, mas aqueles que foram detectados por PCR em tempo real tinham menos dias com sintomas à admissão do que os que foram não detectados ($5,2 \pm 0,3$ vs. $8,7 \pm 0,7$; $P < 0,0001$). Pode ser também possível que os pacientes se automedicaram com drogas antimicrobianas antes de procurar atendimento

médico, o que prejudicaria tanto a detecção por PCR em tempo real quanto o isolamento. A mesma hipótese foi levantada em estudo conduzido em local onde antimicrobianos de uso oral podiam ser adquiridos sem a retenção do receituário médico no momento da seleção dos pacientes (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011). No nosso estudo, DNA de *Leptospira* foi detectado em amostras de 10 dos 18 (55,5%) casos não confirmados cujo diagnóstico foi baseado na análise de uma única amostra aguda de soro. Entretanto, a PCR em tempo real foi negativa para os cinco casos não confirmados em que uma amostra convalescente também foi analisada. Com base nestas observações, seria esperado que se houvesse disponibilidade da amostra convalescente para os 10 casos não confirmados que tiveram resultado positivo para a PCR em tempo real, a soroconversão seria potencialmente detectada com consequente confirmação dos casos. Assume-se, portanto, que se os 10 casos não confirmados fossem casos verdadeiros de leptospirose, a sensibilidade diagnóstica pode ter sido subestimada. Independentemente, a acurácia diagnóstica observada a partir dos nossos resultados foi comparável a descrições prévias de detecção molecular de leptospirosas em amostras sanguíneas (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011; AHMED *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2007; MERIEN *et al.*, 2005; TRUCCOLO *et al.*, 2001).

Desse modo, o presente estudo avaliou o desempenho analítico e a acurácia diagnóstica de um método baseado em PCR em tempo real previamente descrito na literatura, com o objetivo de diagnosticar precocemente a leptospirose humana. O presente teste mostrou-se adequado tecnicamente para a detecção de DNA de leptospirosas patogênicas e amostras de sangue total. Foi demonstrada a detecção precoce de leptospirosas nas amostras de todos os óbitos analisados. A utilização de ferramentas que permitam o diagnóstico precoce da leptospirose pode facilitar a tomada de decisão clínica, decisiva para manejo do paciente em casos severos e potencialmente fatais.

6.2 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE CARGA BACTERIANA E DESFECHO CLÍNICO EM CASOS DE LEPTOSPIROSE

A quantificação da carga bacteriana pode contribuir para o esclarecimento da história natural da leptospirose em humanos e fornecer informações úteis para o manejo clínico e terapêutico dos pacientes. Foi constatado previamente que pacientes com

desfechos graves decorrentes da leptospirose apresentavam cargas bacterianas mais altas do que aqueles com sintomatologia mais branda (MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005; TRUCCOLO *et al.*, 2001). Entretanto, como esses estudos foram baseados em relatos de caso (ROCZEK *et al.*, 2008) ou em estudos sistemáticos conduzidos com número limitado de pacientes confirmados e bem caracterizados (MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005), não foram apresentadas análises estatísticas consistentes para identificar a carga bacteriana como fator de risco independentemente correlacionado ao desenvolvimento de desfechos graves. Nessa etapa do estudo, almejamos identificar os fatores de risco associados de modo independente ao desenvolvimento de LPHS e óbito em decorrência da leptospirose e estabelecer pontos de corte prognósticos para o valor de carga bacteriana associada a esses desfechos.

Para a condução dessa fase do estudo, foi necessário realizar algumas adequações técnicas em relação aos parâmetros empregados na etapa de validação. O método de extração de DNA foi alterado em relação ao utilizado para a avaliação do desempenho diagnóstico da PCR em tempo real, pois assim foi possível automatizar o processo usando a plataforma disponível no laboratório durante o período de realização do estudo. Essa substituição foi necessária devido a dificuldades para adquirir o primeiro produto, mas foi previamente demonstrada a equivalência de desempenho entre o método usado anteriormente (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue) e o novo método (BioMérieux NucliSENS® EasyMag) (LOENS *et al.*, 2007). Da mesma maneira, a mistura de reação utilizada para as amplificações foi substituída em relação à usada anteriormente nos testes de validação analítica. Além da maior facilidade para compra, a nova mistura de reação faz uso do fluoróforo ROX como referência passiva. Apesar de não ser essencial, o uso desse recurso resulta em leituras de fluorescência mais precisas em equipamentos de PCR em tempo real cujo mecanismo de excitação é baseado em lâmpadas halógenas, como o utilizado nesse estudo (WANG *et al.*, 2007; KUBISTA *et al.*, 2006; BUSTIN, 2005).

Na literatura, poucos estudos relatam o uso de métodos moleculares quantitativos para o monitoramento da leptospirose em humanos. Dentre esses estudos, um foi baseado em hibridização pós-PCR com revelação colorimétrica (TRUCCOLO *et al.*, 2001) e os demais fizeram uso de métodos baseados em PCR em tempo real (MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005). Entretanto, recentes pesquisas mostram que os sistemas moleculares utilizados nesses trabalhos apresentaram desempenho analítico (BOURHY *et al.*, 2011) e diagnóstico (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011) inferiores aos

obtidos com o conjunto de oligonucleotídeos usados no presente estudo (STODDARD *et al.*, 2009). Além disso, a amostra sanguínea utilizada para a quantificação em todos os estudos anteriores foi soro (MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005; TRUCCOLO *et al.*, 2001), previamente demonstrada não ser a amostra de escolha para esse teste (BOURHY *et al.*, 2011; STODDARD *et al.*, 2009; KOSITANONT *et al.*, 2007; LEVETT *et al.*, 2005; PALANIAPPAN *et al.*, 2005).

Na leptospirose, o conhecimento sobre a cinética da infecção em humanos é limitado e derivado da extrapolação de resultados obtidos em experimentos conduzidos em modelos animais (EVANGELISTA & COBURN, 2010). Desse modo, o uso de métodos quantitativos para determinar a carga bacteriana ao longo do curso da doença permitiria melhor compreensão da história natural da doença (MERIEN *et al.*, 2005; TRUCCOLO *et al.*, 2001). Em concordância com resultados obtidos em animais (LOURDAULT *et al.*, 2009), a bacteremia na população estudada atingiu o ápice entre o terceiro e o quarto dias com sintomas, decaindo de modo progressivo e inversamente proporcional ao aumento no título de anticorpos específicos. Na fase imune da doença, a estruturação da resposta imune levou à invasão e colonização de órgãos-alvo como fígado, rins e pulmões, causando alterações fisiológicas refletidas nos sintomas exibidos pelos pacientes e confirmadas laboratorialmente, conforme descrito anteriormente (LOURDAULT *et al.*, 2009; ROCZEK *et al.*, 2008; SEGURA *et al.*, 2005).

A leptospirose tem sido implicada como causa de manifestações hemorrágicas de modo ascendente (BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2001), principalmente a Síndrome de Hemorragia Pulmonar associada à Leptospirose (LPHS). Essa síndrome, descrita pela primeira vez em 1987 no sudeste asiático (PARK *et al.*, 1989), é hoje reportada em todo o mundo (SEGURA *et al.*, 2005; TREVEJO *et al.*, 1998; TREVEJO *et al.*, 1996; ZAKI & SHIEH, 1996; SEHGAL *et al.*, 1995). Em alguns locais, a mortalidade chega a 50% e substituiu a Síndrome de Weil como principal causa de óbito em pacientes com leptospirose (BHARTI *et al.*, 2003). Há indícios de que o mecanismo de patogênese da LPHS seja distinto daquele envolvido na Síndrome de Weil (KO *et al.*, 2009). Apesar de haver relatos anteriores no Rio de Janeiro e em São Paulo (MAROTTO *et al.*, 1999), o primeiro caso foi identificado em Salvador em 2003. Desde então, o número de casos tem aumentado substancialmente e atualmente responde por 19% das hospitalizações e 55% dos óbitos decorrentes da leptospirose (GOUVEIA *et al.*, 2008). A caracterização da população incluída no presente estudo mostrou semelhanças em relação ao reportado em estudo anterior conduzido no mesmo local (GOUVEIA *et al.*, 2008). A maioria dos

pacientes com LPHS identificados nos dois estudos eram homens adultos com idade média superior a 37 anos ($39,8 \pm 15,4$ vs. $37,6 \pm 19,4$ anos). Entretanto, nos dois estudos a proporção de mulheres entre os casos de LPHS foi maior (21,4% e 30,0%) do que aquela entre os casos sem LPHS (12,4% e 13,0%). As mesmas observações foram feitas em estudo conduzido em São Paulo (MAROTTO *et al.*, 2010). A taxa de mortalidade dos nossos pacientes (42,1%) foi semelhante à encontrada em outra população no Sul do Brasil (51%) (VIEIRA & BRAUNER, 2002), sendo ambas menores do que a previamente relatada por Gouveia e colaboradores em 2008 (74,0%). Uma das hipóteses para a redução da mortalidade observada nesse estudo em relação ao estudo anterior (GOUVEIA *et al.*, 2008) foi a identificação precoce dos casos de LPHS e a adoção frequente de medidas intensivas de suporte, como hemodiálise (78,6% vs. 53,0%) e transfusão de concentrado de hemácias (85,7% vs. 60,0%). Apesar de ambos os estudos terem identificado características clínicas como fatores de risco associados ao desenvolvimento de LPHS (insuficiência respiratória e hemoptise), apenas o presente estudo foi capaz de identificar marcadores laboratoriais como fatores independentemente relacionados à LPHS, conforme descrito anteriormente para outras covariáveis (MAROTTO *et al.*, 2010). O fator mais fortemente associado foi carga bacteriana (OR=1,57; CI 95% 1,12-2,24). Dentre os pacientes estudados, aqueles que desenvolveram LPHS apresentaram carga bacteriana significativamente mais alta do que os que não apresentaram sinais de LPHS (199 ± 100 vs. 50 ± 10 GEq/mL; $P < 0,05$). Entre os pacientes com LPHS, os que foram a óbito apresentaram carga bacteriana significativamente mais alta do que os que sobreviveram (2.792 ± 13 vs. 32 ± 127 GEq/mL; $P < 0,001$). Achados semelhantes foram encontrados por Segura e colaboradores em 2005, que relataram cargas bacterianas da ordem de 10^6 GEq/mL em amostras agudas de soro de pacientes que foram a óbito em decorrência da LPHS. É possível especular que a carga bacteriana elevada leve ao estabelecimento precoce de danos vasculares intensos decorrentes do processo séptico, resultando em quadros de hemorragia pulmonar. O achado de hematócrito como fator protetor (OR=0,88; CI 95% 0,81-0,96) reforça essa hipótese (CRAIG *et al.*, 2009; TANTITANAWAT & TANJATHAM, 2003). Apesar de a trombocitopenia ser recorrente nos pacientes com leptospirose (BHARTI *et al.*, 2003; EDWARDS *et al.*, 1982), não foi correlacionada com os quadros de hemorragia pulmonar em alguns estudos (MAROTTO *et al.*, 1999; NICODEMO *et al.*, 1990) e o seu mecanismo molecular não está totalmente elucidado (MEDEIROS *et al.*, 2010). Desse modo, enquanto a contagem de plaquetas fornece estimativa do risco de

eventos hemorrágicos (CHIERAKUL *et al.*, 2008), o hematócrito pode atuar como marcador da anemia normocítica aguda que acompanha os quadros hemorrágicos, como LPHS. Outra possibilidade seria que tanto hematócrito quanto hemoglobina estariam diminuídos como resultado do dano endotelial vascular decorrente do consumo do *pool* plaquetário como decorrência da sepse bacteriana (CRAIG *et al.*, 2009).

Entre os pacientes estudados que foram a óbito em decorrência da leptospirose, os sinais e sintomas mais comumente encontrados à admissão foram febre (94,1%), icterícia (82,4%), oligúria (58,8%) e insuficiência respiratória (56,3%). Esses achados estão de acordo com resultados de estudos conduzidos na França (DUPONT *et al.*, 1997), Portugal (VIEIRA *et al.*, 2006), Coréia (PARK *et al.*, 1989), Barbados (EDWARDS *et al.*, 1990), Hawaii (KATZ *et al.*, 2011), e em diferentes regiões do Brasil (SPICHLER *et al.*, 2008a; VIEIRA & BRAUNER, 2002; DAHER *et al.*, 1999; KO *et al.*, 1999). A frequência do envolvimento pulmonar observado em nosso estudo (56,3%) foi semelhante ao previamente descrito em outros trabalhos (PANAPHUT *et al.*, 2002; DUPONT *et al.*, 1997), mas inferior ao relatado em estudo conduzido em São Paulo (74,0%) (SPICHLER *et al.*, 2008a). Similarmente ao que foi previamente descrito, os fatores de risco independentemente associados ao óbito identificados em nosso estudo foram idade entre 35 e 44 anos, oligúria e insuficiência respiratória (SPICHLER *et al.*, 2008b; PANAPHUT *et al.*, 2002; DAHER *et al.*, 1999; KO *et al.*, 1999; DUPONT *et al.*, 1997). Dentre esses, o principal preditor de óbito foi idade (OR=11,11; IC 95% 1,95-81,86), apontada previamente como fator de risco independente para óbito em estudos conduzidos em Salvador (KO *et al.*, 1999) e Fortaleza {}. Insuficiência renal aguda, principalmente quando acompanhada de oligúria, foi previamente apontada como importante fator de risco independente para óbito (SPICHLER *et al.*, 2008b; BHARTI *et al.*, 2003). Em nosso estudo, oligúria foi o segundo fator de risco independente para óbito mais importante (OR=8,89; IC 95% 2,15-47,62). Conforme previamente afirmado (SPICHLER *et al.*, 2008a), mesmo em locais com altas taxas de envolvimento pulmonar e óbito devido à LPHS (GOUVEIA *et al.*, 2008; SPICHLER *et al.*, 2008a; MAROTTO *et al.*, 1999), a oligúria permanece sendo um fator independentemente associado ao óbito (DAHER *et al.*, 1999; KO *et al.*, 1999). Em nosso estudo, bilirrubina direta foi identificada como fator de risco na análise univariada, enquanto icterícia à admissão não foi identificada como fator de risco. Essa observação possivelmente é devida ao caráter subjetivo da avaliação de icterícia. Esse mesmo fenômeno foi observado em estudos prévios (SPICHLER *et al.*, 2008a; DAHER *et al.*, 1999; KO *et al.*, 1999; DUPONT *et al.*, 1997). Nenhum dos dois parâmetros

foi identificado nesse estudo ou nos anteriormente citados como fator de risco independente para óbito. Conforme previamente discutido na identificação de fatores de risco para LPHS, trombocitopenia não é um fator de risco comumente associado ao óbito por leptospirose (SPICHLER *et al.*, 2008a; TANTITANAWAT & TANJATHAM, 2003). Em nosso estudo, trombocitopenia moderada foi identificada como fator de risco na análise univariada (OR=1,66; IC 95% 0,58-4,48), mas não foi incluída no modelo multivariado final para identificação de fatores de risco independentes. Entretanto, hematócrito foi identificado como fator protetor independente para óbito. Novamente, acredita-se que tanto hematócrito quanto hemoglobina estariam diminuídos como resultado da ativação da cascata de coagulação (CHIERAKUL *et al.*, 2008), que também responderia pelo consumo plaquetário e consequente trombocitopenia (CRAIG *et al.*, 2009; TANTITANAWAT & TANJATHAM, 2003). Nosso estudo foi o primeiro a identificar a carga bacteriana como fator de risco independente para óbito (OR=6,05; IC 95% 2,98-17,02). Apesar de outros estudos terem apresentado evidências dessa correlação (MERIEN *et al.*, 2005; SEGURA *et al.*, 2005; TRUCCOLO *et al.*, 2001), ela não havia sido demonstrada com embasamento estatístico. Mesmo tendo observado concordâncias para a maioria dos achados estatísticos, é necessário ter em mente que divergências foram percebidas como resultado do uso de diferentes critérios de inclusão e exclusão, definição de caso, e de parâmetros clínicos entre os estudos (CRAIG *et al.*, 2009; DAHER *et al.*, 1999).

Do mesmo modo observado anteriormente para identificação da carga bacteriana como fator de risco independente, os estudos quantitativos anteriores apresentaram valores prognósticos vitais embasados na simples observação dos dados resultantes dos estudos. Truccolo e colaboradores (TRUCCOLO *et al.*, 2001) apresentaram um ponto de corte prognóstico associado a óbito estimado em 1×10^4 leptospiplas/mL de soro com base na análise de 12 pacientes, sendo três óbitos. Foi detectado DNA de leptospiplas em nove entre 13 (69%) amostras com título recíproco de MAT igual ou superior a 400. Merien e colaboradores (MERIEN *et al.*, 2005) avaliaram a carga de leptospiplas em 51 pacientes com suspeita clínica de leptospirose exibindo sintomas por períodos entre zero e 30 dias. A média da carga bacteriana encontrada para esses pacientes foi de 1×10^3 leptospiplas/mL de soro. Segura e colaboradores (SEGURA *et al.*, 2005) quantificaram a carga bacteriana em amostras de soro, urina ou tecidos obtidos de sete pacientes com sinais e sintomas de LPHS, dos quais apenas um sobreviveu. Os resultados indicam cargas altas em todas as amostras testadas e os autores sugeriram um valor prognóstico

vital de 1×10^4 leptospiras/mL. A abordagem utilizada no nosso estudo para a determinação dos pontos de corte prognósticos foi baseada no uso de curvas ROC, vastamente utilizadas para avaliar a acurácia prognóstica de métodos diagnósticos (POLLARA *et al.*, 2011; LINDEN, 2006; GREINER *et al.*, 2000; ZWEIG & CAMPBELL, 1993). Nossos resultados apontaram pontos de corte prognósticos de 159 GEq/mL para LPHS e 1.181 GEq/mL para óbito, bastante inferiores aos valores propostos anteriormente na literatura. Esses valores resultaram em sensibilidade de 64,3% (IC 95% 35,1-87,2%) e 76,5% (IC 95% 50,1-93,2%), respectivamente. A especificidade foi 68,8% (62,8-74,3%) para LPHS e 89,3% (IC 95% 85,0-92,8%) para óbito. A acurácia prognóstica das curvas ROC foi 88,3% para óbito e 68,0% para LPHS. A acurácia de ambas as curvas foi considerada moderada (LINDEN, 2006). Esse é o primeiro relato da utilização de curvas ROC para a determinação do valor prognóstico da carga bacteriana em relação a óbito e LPHS decorrentes da leptospirose. Entretanto, uma importante limitação da análise foi a utilização de curvas ROC univariadas, que levam em conta apenas uma variável explicativa (carga bacteriana) e uma variável de desfecho (óbito ou LPHS) (ZWEIG & CAMPBELL, 1993). Para uma estimativa mais adequada, seria necessário construir curvas ROC multivariadas, que levam em conta diversas combinações de variáveis explicativas para cada variável de desfecho (SHULTZ, 1995), como foi proposto para o diagnóstico diferencial da leptospirose (LIBRATY *et al.*, 2007) e para a validação de um modelo multivariado preditivo para LPHS (MAROTTO *et al.*, 2010). Com essa ferramenta, que levaria em conta todos os fatores de risco independentes identificados na análise multivariada e cujos valores são facilmente determinados para pacientes hospitalizados, a equipe médica teria à disposição um método simples para determinar de modo acurado os pacientes em maior risco para desenvolvimento de desfechos graves (MAROTTO *et al.*, 2010).

Como a construção dos modelos multivariados levou em conta apenas uma pequena parte das interações possíveis entre as variáveis selecionadas, é provável que os modelos não reflitam com precisão os reais efeitos de cada variável explicativa sobre a variável resposta em questão. Esse fato possivelmente foi decorrente do pequeno número amostral para os grupos de desfechos de interesse (óbito e LPHS). Outro aspecto que merece atenção é o fato de os modelos logísticos multivariados utilizados nesse e em estudos anteriores serem modelos lineares generalizados. Assim, avaliam associações entre a variável resposta e as variáveis explicativas sob a ótica linear, que nem sempre é a relação que rege os fenômenos biológicos (DEAN & NIELSEN, 2007;

LINDSEY, 1999). Do mesmo modo, o modelo multivariado final é diretamente dependente das variáveis que o compõem (NITTA *et al.*, 2010). Sendo assim, seria necessário maior uniformidade no desenho dos estudos, nos critérios de seleção de pacientes e de definição das variáveis para permitir a comparação direta das razões de chances observadas nos diferentes estudos.

A partir dos dados analisados concluímos que a carga bacteriana é um fator de risco independentemente associado a desfechos graves da leptospirose, como LPHS e óbito. Adicionalmente, foram propostos pontos de corte prognósticos para carga bacteriana determinados por análise ROC. Além do potencial prognóstico, a quantificação de leptospiros patogênicas em amostras clínicas pode ter aplicação no monitoramento do tratamento, avaliação prognóstica, avaliação da eficácia de protótipos vacinais e estudos de patogênese em animais.

6.3 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

A ameaça para a Saúde Pública imposta pela leptospirose é mundialmente subestimada. A sintomatologia altamente variável e inespecífica prejudica o diagnóstico clínico e salienta a importância do uso de ferramentas para detecção precoce e efetiva para ambos o diagnóstico laboratorial da doença e determinação do risco ambiental. Métodos baseados em PCR em tempo real foram apontados como ferramentas úteis para detectar, monitorar e quantificar o risco de contaminação imposto à população pelo contato com fontes de água contaminadas com *Leptospira* (WONG *et al.*, 2008; GANOZA *et al.*, 2006). Essa etapa do estudo foi focada na otimização de parâmetros de concentração, seleção do método de extração de DNA e determinação do volume inicial de amostra para uma variedade de matrizes ambientais de água que podem potencialmente ser usadas para o monitoramento ambiental, utilizando um sistema de detecção baseado em PCR em tempo real previamente descrito (STODDARD *et al.*, 2009).

Nesse estudo, foram testadas diferentes abordagens para concentração bacteriana baseadas em centrifugação e filtração das amostras ambientais de água. Nossos resultados mostraram uma maior recuperação de DNA a partir do uso de

métodos de centrifugação. Conforme foi previamente postulado, é possível que os poros das membranas de filtração tenham sido entupidos pelos detritos presentes nas amostras túrbidas, prejudicando a capacidade de processar grandes volumes de água (ZARLENGA & TROUT, 2004). Nós observamos esse efeito quando avaliamos o PowerWater DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA), que faz uso de uma etapa preliminar de filtração para a concentração das amostras. Apesar do rendimento de DNA de leptospiros ter sido satisfatório para as amostras límpidas contaminadas artificialmente, baixas taxas de recuperação foram obtidas para as amostras túrbidas. Com base nesse achado, a centrifugação foi selecionada como método de concentração das amostras, uma vez que pode ser acoplado a uma variedade de métodos comerciais para extração de DNA, além de poder ser prontamente implementada nos laboratórios independentemente da viabilidade de recursos financeiros.

Vários fatores podem ter contribuído para desempenho superior dos kits de extração de DNA da MOBIO em relação ao QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) para as amostras ricas em material particulado, conforme foi previamente demonstrado (DAUPHIN *et al.*, 2009; BEHETS *et al.*, 2007; WHITEHOUSE & HOTTEL, 2007). Os kits comerciais avaliados no nosso estudo (QIAamp DNA mini kit, PowerSoil DNA Isolation and PowerWater DNA Isolation kits) utilizam colunas de sílica para reter moléculas de DNA de alto peso molecular (BRAID *et al.*, 2003). Se presentes no lisado, moléculas inibidoras (material orgânico dissolvido, metais, sais e algumas proteínas) competem com os ácidos nucleicos pelos sítios preferenciais de ligação à sílica, levando à perda das moléculas de DNA no filtrado (LLOYD *et al.*, 2010). Os dois kits da MOBIO avaliados no nosso estudo usam protocolos nos quais uma etapa de *bead-beating* foi adicionada à etapa de lise para aprimorar tanto a dessorção bacteriana dos sedimentos quanto a ruptura das suas estruturas celulares. A quebra das moléculas de DNA causada pelo processo de *bead-beating* pode ter levado a interações mais fracas com os sedimentos do que seria observado para moléculas intactas de DNA genômico. Sendo assim, moléculas de DNA menores e fragmentadas seriam mais facilmente dessorvidas do sedimento durante o processo de extração de DNA (BONOT *et al.*, 2010). Esses protocolos de extração de DNA também incluem um passo de floculação catiônica de substâncias húmicas anterior ao carregamento das colunas de sílica. Uma vez que esses complexos químicos foram removidos por centrifugação, fomos capazes de recuperar quantidades maiores de DNA para amplificação por qPCR.

A observação de que alíquotas com volume maior de amostra levaram a uma menor quantificação do DNA de leptospiros em todas as matrizes de água analisadas pode ter sido devida à presença de maiores quantidade de inibidores nas amostras após a etapa de concentração. Apesar de o kit PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA) ter sido concebido para remover substâncias inibitórias presentes nas amostras ambientais, não pudemos excluir a possibilidade de que a quantidade de inibidores contida nas alíquotas de grande volume ultrapassou a capacidade de ligação e remoção do kit. Compostos húmicos, cátions divalentes e sais são conhecidos por reduzir dramaticamente a eficiência da amplificação do DNA durante a PCR (WILSON, 1997). A quantificação mais baixa do DNA de *Leptospira* a partir de volumes maiores seria, portanto, resultado da diminuição da eficiência da PCR causada por inibição da *Taq* DNA polimerase, ao invés de ser decorrente de baixa recuperação durante o processo de extração de DNA. Apesar de todas as DNA polimerases sofrerem de algum modo a influência de inibidores, algumas enzimas derivadas de organismos que não *Thermus aquaticus*, assim como algumas *Taq* DNA polimerases modificadas geneticamente são conhecidas por tolerarem a maioria dos inibidores presentes em amostras de sangue e solo (BAAR *et al.*, 2011; KERMEKCHIEV *et al.*, 2009). Foi relatado que o uso dessas enzimas em conjunto com combinações de aditivos permitiu a amplificação direta do DNA-alvo a partir de amostras clínicas, suplantando a necessidade das etapas prévias de extração e purificação do DNA (ZHANG *et al.*, 2010). De modo similar, seu uso poderia otimizar a amplificação por PCR do DNA extraído de amostras complexas como aquelas obtidas em grande parte dos estudos ambientais. Uma das limitações dessa etapa do estudo foi não ter sido utilizado um mecanismo de controle interno para monitorar a eficiência da extração do DNA e da amplificação por PCR. Uma vez que não é possível antever com precisão a quantidade de compostos inibidores presentes nas amostras ambientais, o uso de um controle interno seria útil para correlacionar a presença de inibidores com a eficiência da amplificação do DNA (BEHETS *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que a adição de *E. coli* à água ultrapura aumentou a recuperação de *Leptospira* após concentração por centrifugação. A adesão dos micro-organismos a uma superfície é decorrente de interações mediadas por características individuais da bactéria, do substrato e do fluido utilizado para suspensão. Foi demonstrado que as leptospiros possuem superfície relativamente hidrofóbica, que adere com alta eficiência a outras superfícies hidrofóbicas como vidro e polipropileno

(KEFFORD & MARSHALL, 1986). Apesar de termos usado tubos de polipropileno para a centrifugação com a intenção de aumentar a aderência do sedimento de leptospiros durante o processo de concentração, nossos dados apontaram que a recuperação do DNA de leptospiros a partir da água ultrapura (nosso controle de inibição) era a menor entre todas as amostras, utilizando o PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA) para extração do DNA. Acreditamos que o sedimento de bactérias pode ter sido perdido durante o processo de remoção do sobrenadante após a centrifugação. Após a comparação com os resultados obtidos para as demais matrizes de água avaliadas, postulamos que a presença de material em suspensão poderia ter um efeito positivo sobre a recuperação do DNA, conforme foi descrito anteriormente para a técnica de separação imunomagnética (FENG *et al.*, 2003; BUKHARI *et al.*, 1998). Deste modo, a adição de uma substância inerte (carvão ativado, sílica) a amostras pobres em material particulado em suspensão poderia teoricamente melhorar a formação do sedimento e aumentar sua estabilidade. Carvão ativado e sílica são materiais porosos que podem adsorver moléculas e partículas em suspensão na amostra, incluindo substâncias húmicas (WERSHAW, 1989). Contudo, os micro-organismos de interesse podem ser irreversivelmente aprisionados nos poros desses materiais, levando à redução da recuperação bacteriana e da sua posterior quantificação (VAN DER MEI *et al.*, 2008). Nós demonstramos que outra bactéria pode atuar como matéria inerte em amostras de água límpidas, cosedimentando com as leptospiros para gerar um sedimento mais estável devido à sua maior área de superfície. Além disso, uma maior quantidade de material em suspensão gerou um sedimento mais visível e menos suscetível à perda durante o processo de remoção do sobrenadante. Entretanto, essa abordagem só por ser utilizada quando o sistema de detecção por PCR em tempo real é altamente específico e comprovadamente não gera resultados falso-positivos mesmo na presença de altas concentrações da bactéria usada como matéria inerte. Nesse estudo, *E. coli* foi utilizada devido à sua fácil manutenção, rápido crescimento e disponibilidade. *E. coli* não foi adicionada às amostras de esgoto porque se sabe que ela já está presente em grandes quantidades, assim como outros coliformes fecais, nesse tipo de matriz (PEPPER *et al.*, 2010).

A quantificação das amostras contaminadas artificialmente foi realizada utilizando uma curva-padrão composta de diluições seriadas 1:10 do DNA extraído de cultura de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa L1-130. O coeficiente de correlação de Pearson (*r*) foi igual ou superior a 0,97 para todas as amostras avaliadas, mostrando forte

correlação entre a quantidade de bactérias contadas microscopicamente e usadas para a contaminação; e a quantificação obtida por qPCR. A comparação por ANOVA dos coeficientes angulares das retas geradas por regressão linear revelou que algumas das linhas eram paralelas entre si. Esse resultado fornece evidências de baixa variação nas eficiências dos processos de extração de DNA e qPCR entre as amostras testadas. Contudo, os coeficientes lineares foram significativamente distintos entre as retas como reflexo dos diferentes LMD. Os LMD com 95% de *hit-rate* calculados por análise probit variaram entre menos de 1 *Leptospira*/mL (para amostra de água de rio contaminada com *E. coli*) a 1,624 *Leptospira*/mL (para água ultrapura sem adição de *E. coli*). Esses resultados enfatizam a correlação entre a eficiência do processo de concentração e extração de DNA, e a quantificação por qPCR. Nossos dados mostraram que o LMD foi inversamente proporcional à turbidez das amostras, exceto para água ultrapura. Especula-se que a turbidez das amostras ambientais de água reflita indiretamente a quantidade de inibidores (majoritariamente matéria orgânica dissolvida) presente nessas amostras, e seu consequente efeito inibitório sobre a PCR. Sendo assim, o LMD seria uma função direta da quantidade de inibidores presente na amostra, da perda durante o processo de concentração, da eficiência da extração de DNA e dos efeitos inibitórios sobre a *Taq* DNA polimerase.

Nessa etapa do estudo, foram selecionados o kit para extração de DNA, os parâmetros de concentração e o volume inicial de amostra para quantificação do DNA de leptospiros patogênicos em amostras ambientais de água. Apesar de haver necessidade de validação em estudos ambientais, esse método potencialmente permite a determinação efetiva, rápida e sensível do risco de infecção oferecido pelo ambiente.

6.4 MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *LEPTOSPIRA*

O crescimento dramático das favelas urbanas tem sido uma das principais transformações sociais globais nos últimos 50 anos. Atualmente, um bilhão de pessoas reside em favelas, respondendo por 78% da população urbana dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (PAPPAS *et al.*, 2008; PROGRAMME, 2003). O rápido processo de urbanização e a notável desigualdade social alteraram o padrão

epidemiológico da leptospirose em países como o Brasil, em que a doença acomete majoritariamente a parcela mais pobre da população (KO *et al.*, 1999). As condições ecológicas que se estabeleceram nas favelas favoreceram a instalação de grandes colônias de *Rattus norvegicus* (DE MASI *et al.*, 2009), implicados como principais reservatórios da leptospirose nesses locais (PEREZ *et al.*, 2011; AGUDELO-FLÓREZ *et al.*, 2009; DE FARIA *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a infecção por leptospiros acontece no ambiente peridomiciliar (SOARES *et al.*, 2010; DE FARIA *et al.*, 2008; MACIEL *et al.*, 2008; SARKAR *et al.*, 2002), presumivelmente a partir do contato com o ambiente contaminado com a urina dos ratos. Fatores como pH, salinidade, temperatura e umidade podem levar à sobrevivência das leptospiros no ambiente por vários meses (FAINE *et al.*, 1999; KARASEVA *et al.*, 1973). Alguns estudos anteriores objetivaram detectar o DNA de leptospiros em amostras ambientais de água (VIAU & BOEHM, 2011; VITAL-BRAZIL *et al.*, 2010; LUCHINI *et al.*, 2008; TANSUPHARISI *et al.*, 2006), mas apenas um relatou a quantificação da carga bacteriana nas amostras estudadas (GANOZA *et al.*, 2006). Assim, essa etapa do nosso estudo almejou a identificação sistemática dos reservatórios ambientais de infecção na comunidade de Pau da Lima, com quantificação da carga bacteriana nessas amostras.

O presente estudo foi desenhado para avaliar experimentalmente condições ambientais que foram previamente associadas ao maior risco de infecção ou a cargas bacterianas mais elevadas. A estratificação para avaliação dos fatores macroambientais não foi balanceada em virtude da demonstração prévia da residência em altitudes mais altas como fator protetor para a infecção por *Leptospira* (REIS *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que proporcionalmente não houve diferenças de positividade entre as altitudes avaliadas. Entretanto, considerando apenas as amostras positivas, 50% foram coletadas no fundo do vale. Isso era esperado tendo em vista que esgotos a céu aberto são mais frequentemente encontrados nessa altitude do que nas demais (REIS *et al.*, 2008). Além disso, nos períodos de chuva, o fundo de vale é a área mais vulnerável a alagamentos. Nessas situações, há transbordamento dos canais de esgoto e consequente contaminação da área circundante. Assim, acredita-se que a altitude da residência seja um marcador para o grau de contato dos indivíduos com a água de enchente em seus ambientes peridomiciliares (REIS *et al.*, 2008), fato previamente demonstrado como fator de risco independente em estudo conduzido no mesmo local (SARKAR *et al.*, 2002).

A segunda hipótese contemplada no desenho experimental foi a possibilidade de diferenças de positividade e quantificação da carga bacteriana para amostras coletadas em diferentes períodos ao longo do dia. Foi encontrada maior positividade entre as amostras coletadas pela manhã em relação àquelas coletadas no final da tarde (17,7% vs. 5,8%). Acredita-se que esse resultado seja um reflexo do comportamento dos ratos, que são os reservatórios da doença na área estudada. A falha em identificar diferenças de quantificação entre períodos do dia em áreas nas quais os reservatórios não foram identificados reforça essa hipótese (VIAU & BOEHM, 2011). As espécies do gênero *Rattus* têm hábitos noturnos (DE MASI *et al.*, 2009). Sendo animais ativos, normalmente circulam em um raio de 30-150m de suas tocas (REIS *et al.*, 2008). Esses animais são sociais e dominantes e usam a marcação territorial com urina como sinalização química para comunicação entre os indivíduos (HOPP & TIMBERLAKE, 1983; MCINTOSH *et al.*, 1979). Tendo em vista a presença de grandes colônias de ratos na comunidade estudada (DE FARIA *et al.*, 2008), sua alta capacidade de reprodução (DE MASI *et al.*, 2009) e a característica sexual da marcação territorial (MANZO *et al.*, 2002), era esperado que as amostras coletadas pela manhã refletissem de modo mais acurado o comportamento e a atividade noturna dos roedores.

A terceira hipótese contemplada no desenho experimental foi a possibilidade de haver diferenças de positividade e carga bacteriana entre diferentes matrizes de água ambiental (esgoto e água empoçada), conforme previamente demonstrado (VITAL-BRAZIL *et al.*, 2010; GANOZA & VINETZ, 2006; TANSUPHARISI *et al.*, 2006; SEGURA *et al.*, 2005). Assim, podemos especular que a contaminação da água empoçada possa ser decorrente dos extravasamentos dos canais de esgoto a céu aberto durante períodos de chuva. Outra suposição seria maior possibilidade de lise celular bacteriana em amostras de água empoçada, como decorrência das características físico-químicas dessa matriz. Também pode ser considerada a possibilidade de formação de biofilmes nos canais de esgoto, como foi especulado em outras localidades (VIAU & BOEHM, 2011).

A quarta hipótese contemplada no desenho experimental foi haver diferenças de quantificação da carga bacteriana em decorrência dos diferentes padrões de precipitação pluviométrica ao longo do ano. Nossos resultados mostraram que durante o período úmido tanto a positividade (16,0% vs. 9,7%) quanto à média da carga bacteriana nas amostras ($2,69 \pm 8,51$ vs. $1,5 \pm 4,0$ GEq/mL) foram significativamente mais altas do que as do período intermediário. Não há explicações definitivas para esse achado, mas é

possível especular que as condições climáticas do período úmido (menor temperatura ambiente, maior umidade relativa do ar, menor incidência solar) favoreçam a sobrevivência, viabilidade e conservação das estruturas celulares das leptospiros no ambiente, permitindo maior recuperação do DNA bacteriano. Esses dados apresentam evidências de que o maior número de casos de leptospirose observados na comunidade de Pau da Lima durante o período chuvoso do ano seja fruto não apenas do maior contato com água de enchente (REIS *et al.*, 2008; SARKAR *et al.*, 2002), mas também da maior relação dose-inóculo potencialmente presente.

As cargas bacterianas observadas no nosso estudo foram consideravelmente mais baixas do que as reportadas anteriormente por Ganoza e colaboradores (GANOZA *et al.*, 2006). Entretanto, são um pouco mais altas do que as relatadas em estudo mais recente (VIAU & BOEHM, 2011). Ambos os estudos utilizaram método baseado em PCR em tempo real que tem como alvo o gene *rrs* 16S (SMYTHE *et al.*, 2002). O genoma das leptospiros contém duas cópias desse gene, que é altamente conservado entre as espécies. Conforme discutido anteriormente para amostras clínicas, há evidências de que esse sistema tenha limitações quanto à especificidade analítica (THAIPADUNPANIT *et al.*, 2011), o que levaria à detecção e quantificação de espécies saprófitas de *Leptospira*, comumente presentes em amostras ambientais de água (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Esse fato foi demonstrado utilizando um sistema de PCR convencional que tem como alvo a mesma região do gene *rrs* 16S utilizado no sistema de PCR em tempo real (VITAL-BRAZIL *et al.*, 2010). Para contornar essa limitação, os trabalhos que relatam o uso dessa técnica (VIAU & BOEHM, 2011; GANOZA *et al.*, 2006) apresentaram dados de sequenciamento para justificar os resultados relatados. Como a região estudada apresenta poucos polimorfismos genéticos, o tipo de DNA polimerase usada para gerar os produtos de PCR para sequenciamento é crucial. Como os trabalhos não relataram o uso de DNA polimerase com atividade exonucleásica 3'-5' (JOHNSON, 2010), a incerteza sobre a amplificação de espécies saprófitas persistiu. Outra justificativa para os valores mais baixos de positividade e carga bacteriana seria a presença de compostos com efeito inibidor sobre a atividade da DNA polimerase, mesmo após o processo de extração. Essa possibilidade foi minimizada pela construção e uso de um controle interno do tipo *armored* DNA. Essa construção foi adotada ao invés de um plasmídeo por sua resistência à degradação por exonucleases (MENG *et al.*, 2009; STEVENSON *et al.*, 2008), potencialmente presentes em amostras ambientais. O vetor M13mp18, derivado do bacteriófago M13, foi utilizado ao invés do bacteriófago lambda

pela maior facilidade para manipulação genética e manutenção das cepas de *E. coli* infectadas (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Todas as amostras avaliadas nessa etapa do estudo apresentaram resultado satisfatório para a recuperação do controle interno.

Os resultados obtidos nessa etapa do estudo mostraram que o método de PCR em tempo real pode potencialmente ser empregado para o monitoramento da carga bacteriana em amostras ambientais de água. O uso sistemático dessa tecnologia permitiria definir e quantificar os parâmetros ecológicos que regem a transmissão da leptospirose intra e interespécies. Esse conhecimento é essencial para a melhor compreensão da epidemiologia da leptospirose humana e é crítico para a elaboração de programas de controle que objetivem a redução da população de roedores com consequente redução do risco de infecção em humanos.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados e observações resultantes desse trabalho foi possível concluir:

- A. O método baseado em PCR em tempo real apresentou desempenho diagnóstico adequado quando realizado a partir de amostras de sangue total em EDTA, coletadas nos primeiros seis dias a partir do início dos sintomas.
- B. A carga bacteriana foi identificada como fator de risco independentemente associado ao desenvolvimento de LPHS e óbito.
- C. A partir da seleção de kit de extração de DNA, parâmetros de concentração e volume inicial de amostra foi possível otimizar o método de PCR em tempo real para a quantificação do DNA de leptospiros patogênicos em amostras ambientais de água.
- D. O método de PCR em tempo real foi validado para uso no monitoramento ambiental através de estudo prospectivo conduzido com amostras de água de esgoto e água empoçada coletadas durante dois períodos distintos, na comunidade de Pau da Lima, em Salvador (BA).

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas decorrentes dos resultados encontrados nesse estudo, almejam-se:

- A. A publicação do manuscrito “Diagnostic performance of a *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay during urban epidemics of leptospirosis”, a ser submetido para Journal of Clinical Microbiology”;
- B. A publicação do manuscrito “Optimized method for quantification of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples”, a ser submetido para Applied and Environmental Microbiology;
- C. A finalização da construção do modelo aditivo generalizado para predição de risco de LPHS e óbito a partir da associação entre carga bacteriana e demais fatores de risco independentes.
- D. Redação e publicação de manuscrito com os dados finais para predição de risco de LPHS e óbito a partir de valores de carga bacteriana e demais fatores de risco independentes.
- E. Processamento das amostras coletadas no período seco (fevereiro/2012) e finalização das análises referentes à validação do método baseado em PCR em tempo real para monitoramento da carga bacteriana em amostras ambientais de água.
- F. Redação e publicação de manuscrito com os dados finais da validação ambiental do método baseado em PCR em tempo real.
- G. Otimização dos parâmetros de uso do *armored* DNA em amostras ambientais e conclusão do estudo de estabilidade para redação e publicação de manuscrito relatando a técnica de construção.

Referências Bibliográficas

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKADER, R. Acute renal failure in leptospirosis. **Renal Failure**, Oxfordshire, v. 19, n. 2, p. 191-198, 1997.
- ADLER, B.; FAINE, F. The genus *Leptospira*. In: DWORKIN, M. *et al.* **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. Singapore: Springer, 2006, p. 1037.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. D. L. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AGUDELO-FLÓREZ, P. *et al.* Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellin, Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 81, n. 5, p. 906-910, 2009.
- AHMAD, S. N. *et al.* Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 51, n. 3, p. 195-200, 2005.
- AHMED, A. *et al.* Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 9, p. e7093, 2009.
- AHMED, N. *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 5, n. 5-28, 2006.
- ALEXANDER, A. D. *et al.* Leptospirosis in Puerto Rico. **Zoonoses Research**, New York, v. 2, n. 3, p. 152-227, 1963.
- ANDERS, H. J. *et al.* Signaling danger: Toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington D. C., v. 15, n. 4, p. 854-867, 2004.
- ATZINGEN, M. *et al.* Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1005-1015, 2010.
- AVIAT, F. *et al.* *Leptospira* exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 32, n. 6, p. 463-476, 2009.
- BAAR, C. *et al.* Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. **Nucleic Acid Research**, Tokyo, v. 39, n. 8, p. e51-e51, 2011.
- BARBOSA, A. S. *et al.* A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.

BARCELLOS, C.; SABROZA, P. C. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 10, n. 4, p. 301-313, 2000.

BAROCCHI, M. A. *et al.* Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

BEHETS, J. *et al.* Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 1, p. 137-144, 2007.

BELMAKER, I. *et al.* Risk of transmission of leptospirosis from infected cattle to dairy workers in southern Israel. **The Israel Medical Association Journal**, Ramat Gan, v. 6, n. 1, p. 24-27, 2004.

BENGTSSON, M. *et al.* A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. **Nucleic Acid Research**, Tokyo v. 31, n. 8, p. 2003.

BHARTI, A. R. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BINDER, W. D.; MERMEL, L. A. Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine**, New York, v. 16, n. 6, p. 851-856, 1998.

BLACKSELL, S. D. *et al.* Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* immunoglobulin M antibodies in Laos. **Clinical Vaccine and Immunology**, Washington D. C., v. 13, n. 10, p. 1166-1169, 2006.

BOLAND, M. *et al.* A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 132, n. 2, p. 195-200, 2004.

BONOT, S. *et al.* Improving the recovery of qPCR-grade DNA from sludge and sediment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v. 87, n. 6, p. 2303-2311, 2010.

BOURHY, P. *et al.* Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C. , v. 49, n. 6, p. 2154-2160, 2011.

BOURSAUX-EUDE, C. *et al.* IS1500, an IS3-like element from *Leptospira interrogans*. **Microbiology**, New York, v. 141, n. 9, p. 2165-2173, 1995.

BRAID, M. *et al.* Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 389-393, 2003.

- BRANGER, C. *et al.* Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and immunity**, Washington D. C. , v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.
- BRENNER, D. J. *et al.* Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, n. 2, p. 839-858, 1999.
- BRUM, L.; KUPEK, E. Record linkage and capture-recapture estimates for underreporting of human leptospirosis in a Brazilian health district. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 6, p. 515-20, 2005.
- BUKHARI, Z. *et al.* Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C. , v. 64, n. 11, p. 4495-4499, 1998.
- BULACH, D. M. *et al.* Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D. C., v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.
- BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, D. C., v. 23, n. 3, p. 550-576, 2010.
- BURTH, P. *et al.* Role of nonesterified unsaturated fatty acids in the pathophysiological processes of leptospiral infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 1, p. 51-57, 2005.
- BUSTIN, S. A. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London v. 5, n. 4, p. 493-498, 2005.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, Edinburgh v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CABALLERO, O. L. *et al.* Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 5, p. 1369-1372, 1994.
- CAMPAGNOLO, E. R. *et al.* Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 216, n. 5, p. 676-682, 2000.
- CAPLIN, B. E. *et al.* Competitive rest-time PCR for DNA quantification using fluorogenic hybridization probes. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 10, n. 268A-268A, 1999.

- CERQUEIRA, T. B. *et al.* Renal involvement in leptospirosis - new insights into pathophysiology and treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 248-252, 2008.
- CETIN, B. D. *et al.* Acute renal failure: a common manifestation of leptospirosis. **Renal Failure**, Oxfordshire, v. 26, n. 6, p. 655-661, 2004.
- CHANDRASEKARAN, S.; GOMATHI, S. A standard screening test for the early and rapid diagnosis of leptospirosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 22, n. 1, p. 23-27, 2004.
- CHANG, Y. F. *et al.* Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8190-8197, 2007.
- CHEN, T. Development and present status of a leptospiral vaccine and the technology of vaccine production in China. **Japanese Journal of Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 755-762, 1985.
- CHIERAKUL, W. *et al.* Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, n. 2, p. 254-260, 2008.
- CHOY, H. A. *et al.* Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.
- CRAIG, S. B. *et al.* Haematological and clinical-chemistry markers in patients presenting with leptospirosis: a comparison of the findings from uncomplicated cases with those seen in the severe disease. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 103, n. 4, p. 333-341, 2009.
- CRODA, J. *et al.* Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 593-599, 2010.
- DAHER, E. *et al.* Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 61, n. 4, p. 630-634, 1999.
- DAUPHIN, L. *et al.* Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 30-37, 2009.
- DE FARIA, M. *et al.* Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta tropica**, v. 108, n. 1, p. 1-5, 2008.
- DE FOST, M. *et al.* Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington D. C., v. 10, n. 2, p. 332-335, 2003.

DE MASI, E. *et al.* Environmental conditions and rodent infestation in Campo Limpo district, Sao Paulo municipality, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, London v. 19, n. 1, p. 1-16, 2009.

DEAN, C. B.; NIELSEN, J. Generalized linear mixed models: a review and some extensions. **Lifetime data analysis**, v. 13, n. 4, p. 497-512, 2007.

DIAMENT, D. *et al.* Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 70, n. 4, p. 1677-1683, 2002.

DOLHNIKOFF, M. *et al.* Leptospiral pneumonias. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 230-235, 2007a.

DOLHNIKOFF, M. *et al.* Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 142-148, 2007b.

DORIGATTI, F. *et al.* *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 909-914, 2005.

DUARTE, C. A. B. **Determinação do genótipo de subtipo do vírus da Hepatite C através de microarranjo líquido**. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DUPONT, H. *et al.* Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 720-724, 1997.

EDWARDS, C. N. *et al.* Thrombocytopenia in leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 31, n. 4, p. 827-829, 1982.

EDWARDS, C. N. *et al.* Thrombocytopenia in leptospirosis - the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 35, n. 2, p. 352-354, 1986.

EDWARDS, C. N. *et al.* Leptospirosis in Barbados - a clinical study. **West Indian Medical Journal**, Kingston v. 39, n. 1, p. 27-34, 1990.

ELLINGHAUSSEN, H.; MCCULLOUGH, W. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes -fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 26, n. 45-51, 1965.

EVANGELISTA, K.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, London v. 5, n. 9, p. 1413-25, 2010.

FAINE, S. *et al.* **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999.

- FAISAL, S. *et al.* Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 277-287, 2008.
- FAUCHER, J. F. *et al.* The management of leptospirosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London, v. 5, n. 4, p. 819-827, 2004.
- FÉLIX, S. *et al.* Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. **Clinical and vaccine immunology**, v. 18, n. 12, p. 2026-2030, 2011.
- FENG, Y. *et al.* Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 69, n. 4, p. 1898-1903, 2003.
- FRAGA, T. R. *et al.* Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 5, p. 408-419, 2011.
- GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P. N. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 78, n. 4, p. 628-632, 2008.
- GAMBERINI, M. *et al.* Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 305-313, 2005.
- GANOZA, C. A. *et al.* Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 3, n. 8, p. 1329-1340, 2006.
- GANOZA, C. A.; VINETZ, J. M. Quantification of pathogenic *Leptospira* in surface waters explains urban predominance of severe human leptospirosis in the Peruvian Amazon. **Journal of Investigative Medicine**, Hamilton, v. 54, n. 1, p. 316, 2006.
- GOTSCH, A. *et al.* Nuclease-resistant single-stranded DNA controls for nucleic acid amplification assays. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C. , v. 45, n. 8, p. 2570-2574, 2007.
- GOUVEIA, E. L. *et al.* Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.
- GRAVEKAMP, C. *et al.* Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, London, v. 139, n. 8, p. 1691-700, 1993.
- GREINER, M. *et al.* Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive veterinary medicine**, v. 45, n. 1-2, p. 23-41, 2000.

GROBUSCH, M. P. *et al.* Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic. **Journal of Travel Medicine**, Malden, v. 10, n. 1, p. 55-58, 2003.

GUERREIRO, H. *et al.* Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001.

GUSSENHOVEN, G. C. *et al.* LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 35, n. 1, p. 92-97, 1997.

HAAKE, D. A. *et al.* The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A. *et al.* Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 9, p. E40-E43, 2002.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospiral membrane proteins - variations on a theme? **Indian Journal of Medical Research**, Bombay, v. 121, n. 3, p. 143-145, 2005.

HECKMAN, K. L.; PEASE, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 4, p. 924-932, 2007.

HEINEMANN, M. B. *et al.* Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HERNANDEZ, M. S. *et al.* Outbreaks of animal and human leptospirosis in the province of Ciego de Avila. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v. 57, n. 1, p. 79-80, 2005.

HIGUCHI, R. *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HOCHEDÉZ, P. *et al.* Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 84, n. 4, p. 621-626, 2011.

HOLLAND, P. M. *et al.* Detection of specific polymerase chain-reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA-polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D. C., v. 88, n. 16, p. 7276-7280, 1991a.

HOLLAND, P. M. *et al.* A novel method for detecting polymerase chain-reaction product utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA-polymerase. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 5, n. 4, p. A621-A621, 1991b.

- HOPP, S. L.; TIMBERLAKE, W. Odor cue determinants of urine marking in male rats (*Rattus norvegicus*). **Behavioral and neural biology**, v. 37, n. 1, p. 162-172, 1983.
- HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. *In vitro* susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington D. C., v. 47, n. 8, p. 2646-2648, 2003.
- HUDSON, C. P. *et al.* Severe primary HIV-1 infection among black persons in Barbados. **International Journal of STD & AIDS**, London, v. 8, n. 6, p. 393-397, 1997.
- HUNG, C. C. *et al.* Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. **Nephrology Dialysis Transplantation**, New York, v. 21, n. 4, p. 898-910, 2006.
- IM, J. G. *et al.* Leptospirosis of the lung - radiographic findings in 58 patients. **American Journal of Roentgenology**, Baltimore, v. 152, n. 5, p. 955-959, 1989.
- JANSEN, A. *et al.* Leptospirosis in Germany, 1962-2003. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 7, p. 1048-1054, 2005.
- JOHNSON, K. The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1804, n. 5, p. 1041-1048, 2010.
- JOHNSON, R. C.; ROGERS, P. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. **Journal of Bacteriology**, Washington D. C., v. 88, n. 6, p. 1618-1623, 1964.
- KARASEVA, E. V. *et al.* Results of studying the time of survival of pathogenic *Leptospira* under natural conditions. **Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology**, v. 17, n. 3, p. 339-345, 1973.
- KATZ, A. *et al.* Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999-2008. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 2, p. 221-6, 2011.
- KAWABATA, H. *et al.* flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 45, n. 6, p. 491-496, 2001.
- KEE, S. H. *et al.* Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.
- KEFFORD, B.; MARSHALL, K. C. The role of bacterial surface and substratum hydrophobicity in adhesion of *Leptospira biflexa* serovar Patoc-1 to inert surfaces. **Microbial Ecology**, Bethesda, v. 12, n. 4, p. 315-322, 1986.
- KERMEKCHIEV, M. B. *et al.* Mutants of *Taq* DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 2009.

KMETY, E.; DIKKEN, H. **Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars**. 1st edition ed.: Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*, 1992.

KO, A. I. *et al.* *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KO, A. I. *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, London, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KOSITANONT, U. *et al.* Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 57, n. 2, p. 117-122, 2007.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KUTYAVIN, I. V. *et al.* 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 655-661, 2000.

LETOCART, M. *et al.* Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 35, n. 1, p. 248-253, 1997.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington D. C., v. 14, n. 2, p. 296-327, 2001.

LEVETT, P. N. *Leptospira*. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. Washington D. C.: ASM Press, 2007, p. 1267.

LEVETT, P. N. *et al.* Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, Edimburgh, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2005.

LIBRATY, D. *et al.* A comparative study of leptospirosis and dengue in Thai children. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 1, n. 3, p. e111-e111, 2007.

LINDEN, A. Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis. **Journal of evaluation in clinical practice**, v. 12, n. 2, p. 132-139, 2006.

LINDSEY, J. K. A review of some extensions to generalized linear models. **Statistics in medicine**, v. 18, n. 17-18, p. 2223-2236, 1999.

LLOYD, K. G. *et al.* Quantitative PCR methods for RNA and DNA in marine sediments: maximizing yield while overcoming inhibition. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford v. 72, n. 1, p. 143-151, 2010.

- LOENS, K. *et al.* Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 45, n. 2, p. 421-425, 2007.
- LOURDAULT, K. *et al.* Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 58, n. 5, p. 648-655, 2009.
- LUCHINI, D. *et al.* Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of leptospirosis. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 122, n. 3, p. 229-233, 2008.
- MACIEL, E. A. P. *et al.* Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 1, p. e154, 2008.
- MAJED, Z. *et al.* Identification of variable-number tandem-repeat *loci* in *Leptospira interrogans sensu stricto*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005.
- MANZO, J. *et al.* Neuroendocrine control of urine-marking behavior in male rats. **Physiology & behavior**, v. 75, n. 1-2, p. 25-32, 2002.
- MAROTTO, P. C. *et al.* Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 29, n. 6, p. 1561-1563, 1999.
- MAROTTO, P. C. F. *et al.* Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. **The Journal of infection**, v. 60, n. 3, p. 218-223, 2010.
- MARTÍNEZ, R. *et al.* Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Revista panamericana de salud pública**, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.
- MATSUNAGA, J. *et al.* Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: Relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 75, n. 6, p. 2864-2874, 2007.
- MCBRIDE, A. J. *et al.* Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 206-211, 2007a.
- MCBRIDE, A. J. *et al.* Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. **Clinical Vaccine and Immunology**, Washington D. C., v. 14, n. 9, p. 1245-1248, 2007b.
- MCBRIDE, A. J. A. *et al.* Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.
- MCINTOSH, T. K. *et al.* Urine marking and sexual behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). **Behavioral and neural biology**, v. 26, n. 2, p. 161-168, 1979.

- MEDEIROS, F. D. R. *et al.* Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 155-162, 2010.
- MEITES, E. *et al.* Reemerging leptospirosis, California. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 3, p. 406-412, 2004.
- MENG, S. *et al.* Nuclease-resistant double-stranded DNA controls or standards for hepatitis B virus nucleic acid amplification assays. **Virology Journal**, v. 6, n. 2009.
- MERIEN, F. *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.
- MERIEN, F. *et al.* A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v. 249, n. 1, p. 139-147, 2005.
- MONAHAN, A. M. *et al.* Leptospirosis: risks during recreational activities. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 3, p. 707-716, 2009.
- MORGAN, J. *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzes chain-reaction **Methods in Enzymology**, v. 155, n. 335-350, 1987.
- NAIMAN, B. M. *et al.* Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: Involvement of WC1(+) gamma delta and CD4 T cells. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 70, n. 11, p. 6147-6157, 2002.
- NAKAMURA, M. *et al.* Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the northern part of Okinawa Main Island. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 83-85, 2006.
- NALLY, J. E. *et al.* Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.
- NALLY, J. E. *et al.* Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.
- NARITA, M. *et al.* Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama Islands, Japan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 73, n. 4, p. 652-656, 2005.

- NASCIMENTO, A. L. *et al.* Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 4, p. 459-478, 2004.
- NATARAJASEENIVASAN, K. *et al.* Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 55, n. 5, p. 170-173, 2002.
- NAZARENKO, I. *et al.* Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 2002.
- NICODEMO, A. C. *et al.* Thrombocytopenia and leptospirosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 4, p. 252-259, 1990.
- NITTA, H. *et al.* An introduction to epidemiologic and statistical methods useful in environmental epidemiology. **Journal of epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 177-184, 2010.
- OLIVEIRA, M. A. *et al.* Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 52, n. 2, p. 127-135, 2003.
- PALANIAPPAN, R. U. *et al.* Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cell Probes**, London, v. 19, n. 2, p. 111-117, 2005.
- PANAPHUT, T. *et al.* Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 52-59, 2002.
- PAPPACHAN, M. J. *et al.* Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. **Journal of Epidemiology and Community Health**, London, v. 58, n. 12, p. 1054-1054, 2004.
- PAPPAS, G. *et al.* The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 12, n. 4, p. 351-7, 2008.
- PARK, S. K. *et al.* Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 41, n. 3, p. 345-51, 1989.
- PASTEUR, B. J. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacterium, Distyglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae and Planctomycetes. In: KRIEG, N. R. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, 2010.
- PAVAN, M. E. *et al.* Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 31, n. 1, p. 37-45, 2008.

- PEPPER, I. *et al.* Pathogens and indicators in United States Class B biosolids: national and historic distributions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 39, n. 6, p. 2185-2190, 2010.
- PEREIRA, M. M. *et al.* Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 72, n. 1, p. 13-20, 2005.
- PEREIRA, M. M. *et al.* A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 38, n. 1, p. 450-452, 2000.
- PEREZ, J. *et al.* Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, p. 2011.
- PICARDEAU, M. *et al.* Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.
- PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 10, p. 1265-1276, 2000.
- POLLARA, C. *et al.* Quantitative viral load measurement for BKV infection in renal transplant recipients as a predictive tool for BKVAN. **The New microbiologica**, v. 34, n. 2, p. 165-171, 2011.
- PROGRAMME, U. N. H. S. **The challenge of slums: Global report on human settlements** ed. London: Earthscan Publications Ltd., 2003.
- QIAGEN. **DNeasy Blood & Tissue Handbook**, 2006.
- RAMACHANDRAN, S. *et al.* Patterns of acute renal failure in leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 79, n. 7, p. 158-160, 1976.
- RAMOS, C. R. R. *et al.* A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.
- RATHINAM, S. R. Ocular manifestations of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 189-194, 2005.
- REIS, R. B. *et al.* Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 4, p. e228, 2008.
- REN, S. X. *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, London, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

RISTOW, P. *et al.* The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 7, p. 894-903, 2007.

ROCZEK, A. *et al.* Severe course of rat bite-associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 57, n. 5, p. 658-663, 2008.

ROMERO, E. C. *et al.* Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 245-248, 2003.

ROMERO, E. C. *et al.* Detection of *Leptospira* DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 36, n. 5, p. 1453-1455, 1998.

ROMERO, E. C. *et al.* Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 623-627, 2009.

SALAUN, L. *et al.* Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 44, n. 11, p. 3954-3962, 2006.

SAMBASIVA, R. R. *et al.* Leptospirosis in India and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Working with bacteriophage M13 vectors. In: SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001,

SARKAR, U. *et al.* Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 66, n. 5, p. 605-10, 2002.

SAVIO, M. L. *et al.* Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 32, n. 4, p. 935-941, 1994.

SCHROPPEL, B.; HE, J. C. Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. **Kidney International**, New York, v. 69, n. 5, p. 785-787, 2006.

SEGURA, E. R. *et al.* Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, n. 3, p. 343-351, 2005.

SEHGAL, S. C. *et al.* Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north-Andaman. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 102, n. 9-12, 1995.

- SEHGAL, S. C. *et al.* Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 10, p. 897-901, 2003.
- SEIJO, A. *et al.* Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 1004-1005, 2002.
- SEIXAS, F. *et al.* Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 88-95, 2007.
- SEJVAR, J. *et al.* Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 6, p. 702-707, 2003.
- SELVIN, P. R. Fluorescence resonance energy-transfer. **Biochemical Spectroscopy**, San Diego, v. 246, n. 300-334, 1995.
- SENIOR, K. Leptospirosis and Weil's syndrome: cause for concern? **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, n. 12, p. 823-824, 2010.
- SHULTZ, E. K. Multivariate receiver-operating characteristic curve analysis: prostate cancer screening as an example. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1248-1255, 1995.
- SILVA, H. R. *et al.* Leptospiral infection and subclinical presentation among children in Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 2, p. 227-233, 2003.
- SLACK, A. *et al.* Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 57, n. 4, p. 361-366, 2007.
- SLACK, A. *et al.* An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 55, n. 11, p. 1549-1557, 2006.
- SLACK, A. T. *et al.* Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 4, n. 10, 2005.
- SMITS, H. L. *et al.* International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 37, n. 9, p. 2904-2909, 1999a.
- SMITS, H. L. *et al.* Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 37, n. 12, p. 4179-4182, 1999b.

- SMITS, H. L. *et al.* Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington D. C., v. 8, n. 1, p. 166-169, 2001.
- SMITS, H. L. *et al.* International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 124-128, 2000.
- SMYTHE, L. D. *et al.* A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 13, p. 1-7, 2002.
- SOARES, T. S. M. *et al.* Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo, Southeastern Brazil, 1998 to 2006. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 283-291, 2010.
- SPICHLER, A. *et al.* Interrelationship between thrombocytopenia, acute renal failure and pulmonary involvement in severe leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 79, n. 6, p. 446, 2008a.
- SPICHLER, A. *et al.* Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 9, n. 4, p. 336-340, 2005.
- SPICHLER, A. *et al.* Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 79, n. 6, p. 911-914, 2008b.
- STEFOS, A. *et al.* Leptospirosis and pancytopenia: two case reports and review of the literature. **Journal of Infection**, London, v. 51, n. 5, p. e277-280, 2005.
- STERN, E. J. *et al.* Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 843-849, 2010.
- STEVENSON, J. *et al.* The use of armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 150, n. 1-2, p. 73-76, 2008.
- STOCHER, M.; BERG, J. Internal control DNA for PCR assays introduced into lambda phage particles exhibits nuclease resistance. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2163-2166, 2004.
- STOCHER, M. *et al.* A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. **Journal of Virological Methods**, v. 108, n. 1, p. 1-8, 2003.
- STODDARD, R. A. *et al.* Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

SUAREZ HERNANDEZ, M. *et al.* Human leptospirosis outbreak in the district of Ciego de Avila, Cuba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 1, p. 13-18, 1999.

SUNBUL, M. *et al.* *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 33, n. 12, p. 896-898, 2001.

TANSUPHARISI, U. *et al.* Duplex PCR hybridization-based detection of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 37, n. 4, p. 729-741, 2006.

TANTITANAWAT, S.; TANJATHAM, S. Prognostic factors associated with severe leptospirosis. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 86, n. 10, p. 925-931, 2003.

TERPSTRA, W. J. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. ed. Malta: World Health Organization, 2003.

THAIPADUNPANIT, J. *et al.* Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipI32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 2011.

THAIPADUNPANIT, J. *et al.* A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2007.

THOMAS, D. D.; HIGBIE, L. M. *In vitro* association of leptospires with host cells. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 58, n. 3, p. 581-585, 1990.

TREVEJO, R. T. *et al.* Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage - Nicaragua, 1995. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 5, p. 1457-1463, 1998.

TREVEJO, R. T. *et al.* Leptospirosis epidemic associated with pulmonary hemorrhage - Nicaragua, 1995. **American Journal of Epidemiology**, v. 143, n. 11, p. 124-124, 1996.

TRUCCOLO, J. *et al.* Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative assay. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 204, n. 317-321, 2001.

TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, London, v. 14, n. 3, p. 303-308, 1996.

ULLMANN, L. S.; LANGONI, H. Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 2, p. 119-129, 2011.

VAN CHARANTE, A. W. M. *et al.* Occupational risks of zoonotic infections in Dutch forestry workers and muskrat catchers. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 14, n. 2, p. 109-116, 1998.

VAN DER MEI, H. *et al.* Influence of adhesion to activated carbon particles on the viability of waterborne pathogenic bacteria under flow. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 100, n. 4, p. 810-813, 2008.

VIAU, E. J.; BOEHM, A. B. Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawaiian coastal streams. **Journal of Water and Health**, v. 9, n. 4, p. 637-646, 2011.

VIEIRA, M. L. *et al.* Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. **International Journal of Infectious Diseases**, London, v. 10, n. 5, p. 378-386, 2006.

VIEIRA, S. R. R.; BRAUNER, J. Leptospirosis as a cause of acute respiratory failure: clinical features and outcome in 35 critical care patients. **The Brazilian journal of infectious diseases**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 135-139, 2002.

VINETZ, J. M. *et al.* Sporadic urban leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 125, n. 10, p. 794-798, 1996.

VISITH, S.; KEARKIAT, P. Nephropathy in leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 184-188, 2005.

VITAL-BRAZIL, J. M. *et al.* Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 353-355, 2010.

WAITKINS, S. A. Leptospirosis as an occupational disease. **British Journal of Industrial Medicine**, London, v. 43, n. 11, p. 721-725, 1986.

WANG, G. *et al.* Optimization of 6-carboxy-X-rhodamine concentration for real-time polymerase chain reaction using molecular beacon chemistry. **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 3, p. 391-397, 2007.

WATZINGER, F. *et al.* Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 27, n. 2-3, p. 254-98, 2006.

WERSHAW, R. L. Application of a membrane model to the sorptive interactions of humic substances. **Environmental Health Perspectives**, Durhan, v. 83, n. 191-203, 1989.

WHITCOMBE, D. *et al.* ScorpionsTM primers - a novel method for use in single-tube genotyping. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 65, n. 4, p. A412-A412, 1999.

WHITEHOUSE, C.; HOTTEL, H. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. **Molecular and Cellular Probes**, London v. 21, n. 2, p. 92-96, 2007.

- WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.
- WOLGEMUTH, C. W. *et al.* The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. **Journal of Molecular and Microbiological Biotechnology**, Basel, v. 11, n. 3-5, p. 221-227, 2006.
- WONG, M. *et al.* Quantitative real-time PCR applications proposed for investigations of environmental leptospirosis. **Infection, Genetics and Evolution**, New York, v. 8, n. 4, p. S48-S48, 2008.
- WUTHIEKANUN, V. *et al.* Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, D. C., v. 45, n. 4, p. 1363-1365, 2007.
- YANG, C. W. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. **Kidney International**, New York, v. 72, n. 8, p. 918-925, 2007.
- YANG, C. W. *et al.* Leptospirosis renal disease. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, Oxford, v. 16 Suppl 5, n. 73-77, 2001.
- YASUDA, P. H. *et al.* Desoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 37, n. 407-415, 1987.
- YOUNES-IBRAHIM, M. *et al.* Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 213-223, 1997a.
- YOUNES-IBRAHIM, M. *et al.* Effect of *Leptospira interrogans* endotoxin on renal tubular Na,K-ATPase and H,K-ATPase activities. In: BEAUGE, L. A. *et al.* **Na/K-ATPase and Related Transport ATPases - Structure, Mechanism, and Regulation**. 1997b, p. 684-686.
- YURI, K. *et al.* Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v. 61, n. 5, p. 2270-2272, 1993.
- ZACARIAS, F. G. D. *et al.* Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 744-748, 2008.
- ZAKI, S. R.; SHIEH, W. J. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. **The Lancet**, London, v. 347, n. 9000, p. 535-536, 1996.
- ZARLENGA, D.; TROUT, J. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam v. 126, n. 1-2, p. 195-217, 2004.
- ZHANG, Z. *et al.* Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. **The Journal of Molecular Diagnostics**, New York, v. 12, n. 2, p. 152-161, 2010.

ZIPPER, H. *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 12, p. 2004.

ZUERNER, R. L. *et al.* IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D. C., v. 33, n. 12, p. 3284-3289, 1995.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 561-577, 1993.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Curitiba, 14 de abril de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Irina Nastassja Riediger
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “DESENVOLVIMENTO DE TESTE BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA E ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE LEPTOSPIRA”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de março de 2009. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0046.1.208.000-09
Registro CEP: 300ext006/2009-03

Data para entrega do primeiro relatório: 14 de outubro de 2009.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato", with a stylized flourish extending to the right.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

10.2 ANEXO 2: FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS



QUESTIONÁRIO AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA



Estudo de Leptospirose Dados Epidemiológicos

Código VIGI

Digitação

DGIND

DDGIND

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PACIENTE, ESTE QUESTIONÁRIO DEVERÁ SER DESTACADA PELO INVESTIGADOR PRINCIPAL DEPOIS DA COLETA DE DADOS E ANTES DA DIGITAÇÃO. TODOS OS QUESTIONÁRIOS E REQUISIÇÕES DO MESMO PACIENTE DEVEM TER UM NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO ÚNICO (VIGI).

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nome:	NOME
1.2	Idade:	AGE
1.3	Data de nascimento:	DATANASC
1.4	Sexo:	SEX
	Masculino <input type="checkbox"/> 1 Feminino <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	

II. HISTÓRIA DE LEPTOSPIROSE

2.1	Já teve leptospirose ou a "doença do rato" antes deste episódio?	ANTES
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	
	Sem sim, quando :	ANTESQM
	Mês: <input type="text"/> <input type="text"/> Ano: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	ANTESQA

III. OCUPAÇÃO

3.1	Trabalha ou trabalhou no último ano:	TRAB
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	
3.2	Se não trabalha, qual a ocupação? :	SEMTRAB
	Apenas estudante <input type="checkbox"/> 1 Desempregado <input type="checkbox"/> 3 Dona de casa <input type="checkbox"/> 3 Aposentado <input type="checkbox"/> 4 NSA <input type="checkbox"/> 8	

QUESTIONÁRIO AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

3.3	Se trabalha ou trabalhou no último ano, qual a atividade desempenhada:	<p>A. Trabalha com esgoto Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>b. Pedreiro/construção Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>c. Vendedor ambulante Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>d. Gari/Reciclagem Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>e. Mecânico, chapista Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>f. Outro Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 80%;">PRESG</td><td style="width: 20%;"></td></tr> <tr><td>PEDR</td><td></td></tr> <tr><td>VAMB</td><td></td></tr> <tr><td>GARI</td><td></td></tr> <tr><td>MECAN</td><td></td></tr> <tr><td>OUTRO</td><td></td></tr> </table>	PRESG		PEDR		VAMB		GARI		MECAN		OUTRO	
PRESG															
PEDR															
VAMB															
GARI															
MECAN															
OUTRO															
3.4	Trabalha no bairro que mora?	<p>Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/> Não sabe <input type="text" value="9"/></p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 80%;">TRBAI</td><td style="width: 20%;"></td></tr> </table>	TRBAI											
TRBAI															

IV. EXPOSIÇÕES

4.1	Dentro de 3 semanas antes do início dos sintomas, teve contato com:	<p>a. Lama Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>b. Lixo Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>c. Água de enchente Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>d. Esgoto Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>e. Ratos Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>f. Criação de animais Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>g. Lavoura Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p> <p>i. Água de rio ou lago Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> NSA <input type="text" value="8"/></p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 80%;">LAMA</td><td style="width: 20%;"></td></tr> <tr><td>LIXO</td><td></td></tr> <tr><td>AENCH</td><td></td></tr> <tr><td>ESGOT</td><td></td></tr> <tr><td>RATO</td><td></td></tr> <tr><td>ANIM</td><td></td></tr> <tr><td>LAVO</td><td></td></tr> <tr><td>RIO</td><td></td></tr> </table>	LAMA		LIXO		AENCH		ESGOT		RATO		ANIM		LAVO		RIO	
LAMA																			
LIXO																			
AENCH																			
ESGOT																			
RATO																			
ANIM																			
LAVO																			
RIO																			

10.3 ANEXO 3: FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS



QUESTIONÁRIO APRESENTAÇÃO CLÍNICA



Estudo de Leptospirose Apresentação Clínica

Código VIGI

Digitação

DGIND

DDGIND

PARA PROTEGER A CONFIDENCIALIDADE DO PACIENTE, ESTE QUESTIONÁRIO DEVERÁ SER DESTACADA PELO INVESTIGADOR PRINCIPAL DEPOIS DA COLETA DE DADOS E ANTES DA DIGITAÇÃO. TODOS OS QUESTIONÁRIOS E REQUISIÇÕES DO MESMO PACIENTE DEVEM TER UM NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO ÚNICO (VIGI).

I. IDENTIFICAÇÃO:

1.1	Nome:	NOME
1.2	Idade:	AGE
1.3	Data de nascimento:	DATANASC
1.4	Sexo:	SEX
	Masculino <input type="checkbox"/> 1 Feminino <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	

II. ATENDIMENTO:

2.1	Nº Identificação VIGI:	VIGI
2.2	Data do atendimento ou internamento:	DINTE
2.3	Local de Atendimento ou Internamento:	LOCINTE
	<div> <div>1</div> <div>HC-UFPR</div> <div>4</div> <div>Unidade de Saúde - Curitiba</div> </div> <div> <div>2</div> <div>Hospital Evangélico</div> <div>5</div> <div>Regional de Saúde</div> </div> <div> <div>3</div> <div>HIPP</div> <div>0</div> <div>Outro</div> </div>	
	Se Unidade de Saúde, qual:	US
	Se Regional de Saúde, qual:	RS
	Se outros, qual:	OUT
2.4	Nº de Registro:	REG

QUESTIONÁRIO APRESENTAÇÃO CLÍNICA

III. ENDEREÇO:

3.1	Rua / N°:	END
3.2	Bairro:	BAI
3.3	Cidade:	CID

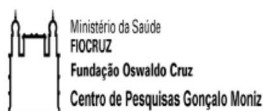
IV. COLETA DE AMOSTRAS:

4.1	SORO COLETADO:		
	A1	SIM <input type="checkbox"/> 1	NÃO <input type="checkbox"/> 0 NSA <input type="checkbox"/> 9
	Data da Coleta: ____/____/____		
	B	SIM <input type="checkbox"/> 1	NÃO <input type="checkbox"/> 0 NSA <input type="checkbox"/> 9
	Data da Coleta: ____/____/____		
4.2	SANGUE COM EDTA COLETADO:		sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0
	Data da Coleta: ____/____/____		
4.3	HEMOCULTURA COLETADA:		SIM <input type="checkbox"/> 1 NÃO <input type="checkbox"/> 0
	Data da Coleta: ____/____/____		

SORO1A
DSORA
SORO1C
DSORC
EDTA
DATEDTA
HEMOCX
DATHEMO

V. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E HISTORIA PRÉVIA:

5.1	Data de início dos sintomas: (999=não sabe)	DIS
5.2	Dias com sintomas: (999=não sabe)	DCS
5.3	Diagnóstico prévio foi Leptospirose:	DGP
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	DGPD
	Se não, qual:	
5.4	Febre:	FEB
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	TAS
5.5	TAS (999) não sabe	
5.6	Fez uso prévio de antibiótico?	ATBP
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	ICA
5.7	Icterícia:	
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	SUFC
5.8	Sufusão Conjuntival:	
	Sim <input type="checkbox"/> 1 Não <input type="checkbox"/> 0 Não sabe <input type="checkbox"/> 9	



QUESTIONÁRIO APRESENTAÇÃO CLÍNICA



5.9	Dispneia:	Sim <input type="text" value="1"/>	Não <input type="text" value="0"/>	Não sabe <input type="text" value="9"/>
5.10	Hemoptise:	Sim <input type="text" value="1"/>	Não <input type="text" value="0"/>	Não sabe <input type="text" value="9"/>
5.11	Tipo de hemoptise:			
	Escarro hemóptico	<input type="text" value="0"/>		
	Hemoptise maciça	<input type="text" value="1"/>		
	Sangue em grande quantidade no tubo orotraqueal	<input type="text" value="2"/>		
	Maciça e sangue no tubo	<input type="text" value="3"/>		
	NSA (Não teve hemoptise)	<input type="text" value="8"/>		
5.12	Frequência Respiratória (ipm):			
5.13	Oligúria	Sim <input type="text" value="1"/>	Não <input type="text" value="0"/>	Não sabe <input type="text" value="9"/>

MDYS
HOP
TIPOHEMOP
FR
OLI

IV. DADOS LABORATORIAIS DAS AVALIAÇÕES INICIAIS:

6.1	Leucócitos: (99999=não sabe)	Data:
6.2	Hematócrito: (99=não sabe)	Data:
6.3	Plaquetas: (999999=não sabe)	Data:
6.4	TGO (99999=não sabe)	Data:
6.5	TGP: (99999=não sabe)	Data:
6.6	Uréia: (999=não sabe)	Data:
6.7	Creatinina: (999=não sabe)	Data:
6.8	Potássio: (9,9=não sabe)	Data:
6.9	Bilirrubina indireta: (99,9=não sabe)	Data:

WBC
WBCD
HTC
HTCD
PLAQ
PLAQD
TGO
TGOD
TGP
TGPD
UREA
UREAD
CREA
CREAD
K
KD
BILI
BILID

QUESTIONÁRIO APRESENTAÇÃO CLÍNICA

6.10	Bilirrubina direta (99,9=não sabe)	Data:	BILD
			BILDD

VII. EVOLUÇÃO CLÍNICA:

7.1	Presença de complicações:						
	Hemorragia GI:	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
	Hemoptise	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
	Tipo de hemoptise	Escarro hemoptóico	0	Maciça	1	Sangue no tubo	2
		Maciça e sangue no tubo	3	NSA	8	Não sabe	9
	Oligúria	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
	Anúria	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
7.2	Diálise peritoneal:						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
	Sem sim, quantos dias:						
7.3	Hemodiálise						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
	Se sim, quantos dias:						
7.4	Transfusões (hemácias):						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
	Se sim, quantas bolsas:						
7.5	Foi internado em UTI:						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
	Se sim, quantos dias:						
7.6	Frequência respiratória máxima (ipm):						
7.7	Usou oxigênio (O2):						
	Sim	1	Não	0			
7.8	Usou drogas vasoativas:						
	Sim	1	Não	0			
7.9	Fez uso de ventilação mecânica:						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
7.10	Fez intubação orotraqueal:						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
7.11	Fez uso de Antibiótico Beta-lactâmico:						
	Sim	1	Não	0	Não sabe	9	
	Ampicilina:	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
	Penicilina	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
	Ceftriaxone	Sim	1	Não	0	Não sabe	9
	Outros	Sim	1	Não	0	Não sabe	9

HEGI	
HOP2	
TIPOHEMOP2	
OLIG	
ANUR	
DIAL	
DIALD	
HEMODIAL	
HEMODIALD	
TRANSF	
QTRANSF	
HCMUTI	
DIAUTI	
MXFR	
USOO2	
DVASO	
VENTMEC	
IOT	
ATB	
AMPI	
PEN	
CTX	
OATB	

QUESTIONÁRIO APRESENTAÇÃO CLÍNICA

VIII. SUMÁRIO DE EXAMES DURANTE A HOSPITALIZAÇÃO: (999=não sabe, 888=não se aplica)

8.1	Máximo de uréia:	MXUR
8.2	Máximo de creatinina:	MXCR
8.3	Potássio: Mínimo:	MNK
	Máximo:	MXK
8.4	Mínimo de hematócrito:	MNHCT
8.5	Mínimo de plaquetas:	MNPLAQ
8.6	Máximo de bilirrubina indireta:	MXBILI
8.7	Máximo de bilirrubina direta:	MXBIL
8.8	Máximo de TGO:	MXTGO
8.9	Máximo de TGP:	MXTGP
8.10	Mínimo de TP:	MNTP

XI. ALTA: (999=não sabe, 888=não se aplica)

9.1	Tipo de alta: Alta <input type="text" value="1"/> Transferência <input type="text" value="2"/> Óbito <input type="text" value="3"/> Não sabe <input type="text" value="9"/> Data da alta:	TALT
		DALT
9.2	Diagnóstico final foi Leptospirose: Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> Não sabe <input type="text" value="9"/> Se não, qual:	DGF
		DGFD
9.3	Evidência para outro diagnóstico final: Sim <input type="text" value="1"/> Não <input type="text" value="0"/> Não sabe <input type="text" value="9"/> Se sim: qual:	EVI
		EVID